



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**TESIS DOCTORAL**

**EFFECTOS DE LOS LIGANDOS DE RECEPTORES LXR SOBRE LA  
ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS Y EL DESARROLLO DE ANEURISMAS  
AÓRTICOS ABDOMINALES**

**Paloma Guillem Llobat**

Madrid, Diciembre de 2012



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**EFFECTOS DE LOS LIGANDOS DE RECEPTORES LXR SOBRE LA  
ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS Y EL DESARROLLO DE ANEURISMAS  
AÓRTICOS ABDOMINALES**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Biociencias Moleculares por:

**Paloma Guillem Llobat**

Director de tesis:

**Miguel Ángel Íñiguez Peña**

Madrid, Diciembre de 2012



**Departamento de Biología Molecular**

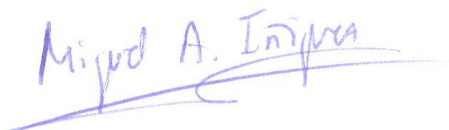
**D. Miguel Ángel Íñiguez Peña, Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid,**

**CERTIFICA**

Que **Dña. Paloma Guillem Llobat**, Licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, y Máster en Biomedicina Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título ***Efectos de los ligandos de receptores LXR sobre la activación de macrófagos y el desarrollo de aneurismas aórticos abdominales.***

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a su evaluación ante el tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctora en Biociencias Moleculares.

En Madrid, a 23 de noviembre de 2012



Dr. Miguel Ángel Íñiguez

Profesor titular de la UAM



---

*Paloma Guillem Llobat ha disfrutado de una beca del Programa propio de ayudas para formación de personal investigador de la Universidad Autónoma de Madrid.*

*Este trabajo de Tesis ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC), siendo financiado por las ayudas a los proyectos “Regulación de la expresión de genes responsables de la producción de prostaglandinas y análisis de su función en cardiomiocitos y macrófagos. Implicaciones en la fisiopatología cardiovascular” (BFU2007-62659/BMC), “Mediadores inflamatorios lipídicos en la fisiopatología cardiovascular” (BFU2010-21055) y “Acciones de prostanoides y ligandos del receptor LXR en procesos inflamatorios y sus implicaciones en la fisiopatología cardiovascular” (SAF2011-23971) otorgadas por el MEC, MICINN y MINECO respectivamente y por una ayuda complementaria de la CAM-UAM (CCG08-UAM/BIO-4299)*

---





## ***AGRADECIMIENTOS***

---



*Cal que neixin flors a cada instant*

Aquest llibre és per Pepa i Mariona (i Ariadna també!) perquè només mirant-vos m'ompliu de vida i de tendresa.

Vull agrair a la meua família pel seu suport incondicional, per ser el meu pilar mestre, per ensenyar-me a caminar per poder ser, i a voler ser per poder caminar...sense vosaltres no ho hauria aconseguit!

Als meus avis, gràcies per haver-me regalat tants moments feliços...el vostre record em fa més forta.

*Wind in my hair, I feel part of everywhere*

Grazie Flavio per starmi vicino e per aiutarmi, per riuscire sempre a strapparmi un sorriso, per convincermi che le stelle sarebbero tramontate...



En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Íñiguez por darme la posibilidad de llevar a cabo este trabajo, de aprender y de seguir desarrollando mi motivación por la investigación en su laboratorio. Agradezco también su dirección a lo largo del proceso de elaboración de esta tesis doctoral.

Al Dr. Manuel Fresno, por invitarnos a compartir las actividades tanto científicas como extra-científicas de su laboratorio.

Al grupo del Dr. Juan Miguel Redondo por aportar ideas y comentarios, y por su ayuda durante mis visitas a su laboratorio. Agradecer en especial a la Dra Vanesa Esteban por su disponibilidad para ayudarme siempre y por enseñarme a inducir aneurismas!

A Bea Barrocal por su excelente ayuda en el animalario y por su paciencia para enseñarme a trabajar con ratones. Gracias por hacer que fueran hasta agradables los momentos más críticos en el C-V!

A todos los compañeros/as del 126, pasados y presentes, por su ayuda y sus ánimos a lo largo de estos cuatro años. Gracias por todos los buenos momentos desde la leche sin “bidifus”, la “silla sagrada”, y hasta el “cierra la nariz que corto el fémur” y muchos más...

Agradecer también a los compañeros del 226 por ser siempre mi primera opción para encontrar consejos y soluciones y por todo el material e ideas que habeis aportado.

A todos los servicios centrales del CBMSO y en especial al personal de animalario y de microscopía por su profesionalidad y la ayuda prestada en el desarrollo de este trabajo.

A Mada por organizar comidas, cenas, y jornadas..y por ser tan amable y facilitar todos los trámites de la tesis.

A todos los que me habeis ayudado y apoyado en estos años tanto desde dentro del trabajo como desde fuera...muchas gracias!!









<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT / RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1. Los receptores LXR</b>	<b>9</b>
1.1. Organización estructural y funcional de los receptores LXR	9
1.2. Mecanismos de trans-activación génica mediada por receptores LXR	11
1.3. Acciones de la activación de receptores LXR en la regulación del metabolismo lipídico	13
<b>2. Acciones anti-inflamatorias de los LXRs</b>	<b>14</b>
2.1. Expresión de genes inflamatorios en macrófagos activados	14
2.2. Acciones de los LXRs sobre la expresión génica en macrófagos activados	16
2.3. Mecanismos de represión de la expresión génica por activación de receptores LXR en macrófagos	17
2.4. Regulación de los efectos anti-inflamatorios de los receptores LXR	18
<b>3. Los receptores LXR en la fisiopatología cardiovascular</b>	<b>19</b>
3.1. Efectos de la activación de los LXR en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares	19
3.2. El aneurisma aórtico abdominal	21
<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>1. Materiales</b>	<b>33</b>
1.1. Modelos animales	33
1.2. Líneas celulares y cultivos primarios	33
1.3. Anticuerpos y reactivos	34
1.4. Oligonucleótidos	36
1.5. Plásmidos	37
<b>2. Métodos</b>	<b>38</b>
2.1. Análisis de la expresión génica mediante <i>RT-PCR</i>	38
2.2. Inmunodetección de la expresión de proteínas mediante <i>Western blot</i>	39
2.3. Transfecciones transitorias y actividad luciferasa	40
2.4. Medición de prostanoides	40

2.5.	Ensayos de migración celular <i>in vitro</i>	41
2.6.	Modelo murino de aneurisma aórtico abdominal	41
2.7.	Tinciones histológicas de secciones de la aorta	42
2.8.	Análisis estadístico	42

## RESULTADOS

<b>1.</b>	<b>Efectos de la activación de receptores LXR sobre la expresión génica en macrófagos</b>	<b>45</b>
1.1.	Expresión de receptores LXR funcionales en macrófagos	45
1.2.	Represión de la expresión de COX-2 y mPGES-1 por efecto de los ligandos de LXR en macrófagos	49
1.3.	Represión de la expresión de COX-2 y mPGES-1 por activación de receptores LXR y RXR en macrófagos	54
1.4.	Factores de transcripción implicados en la represión génica mediada por receptores LXR en macrófagos	59
<b>2.</b>	<b>Efectos de los ligandos de receptores RXR y RAR sobre la expresión de COX-1 en macrófagos</b>	<b>64</b>
2.1.	Inducción de la expresión de COX-1 mediada por activación de receptores RXR en macrófagos	64
2.2.	Caracterización del mecanismo de acción del ácido 9-cis retinoico sobre la expresión de COX-1 en macrófagos	69
<b>3.</b>	<b>Efectos de la activación de receptores LXR sobre la migración de macrófagos</b>	<b>73</b>
<b>4.</b>	<b>Efectos de la activación de receptores LXR en un modelo murino de aneurisma aórtico abdominal</b>	<b>75</b>
4.1.	Caracterización del modelo de AAA en ratones ApoE <sup>-/-</sup>	76
4.2.	Efecto del tratamiento con el ligando TO901317 en ratones ApoE <sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II	80

**DISCUSIÓN**

<b>1. Efectos de la activación de receptores LXR sobre la expresión génica en macrófagos</b>	<b>89</b>
1.1. Expresión de receptores LXR e inducción de genes diana en macrófagos	89
1.2. Represión de la expresión de COX-2 y mPGES-1 inducidas por LPS en macrófagos	90
<b>2. Efectos de los ligandos de receptores RXR sobre la expresión génica en macrófagos</b>	<b>92</b>
2.1. Represión de la expresión de COX-2 y mPGES-1 inducidas por LPS	92
2.2. Inducción de la expresión de la ciclooxigenasa-1	94
<b>3. Acciones de los ligandos de LXR sobre la migración de macrófagos</b>	<b>97</b>
<b>4. Efectos de los ligandos de receptores LXR sobre el desarrollo de lesiones aórticas en un modelo murino de AAA</b>	<b>99</b>

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>105</b>
---------------------	------------

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>109</b>
---------------------	------------



## ***ABREVIATURAS***

---



**Abreviaturas**

25HC	25-hidroxicolesterol
9cisRA	ácido 9- <i>cis</i> retinoico
AAA	aneurisma aórtico abdominal
Act.D	actinomicina D
ADN	ácido desoxirribonucleico
Ang.II	angiotensina II
ApoE	apolipoproteína E
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATRA	ácido <i>all-trans</i> retinoico
BMDM	macrófagos derivados de médula ósea
CCR2	receptor de quimioquinas con motivo C-C tipo 2
CMC	carboximetilcelulosa
COX-1	ciclooxigenasa-1
COX-2	ciclooxigenasa-2
CHX	cicloheximida
DMSO	dimetil sulfóxido
Egr-1	factor de crecimiento temprano-1
FCS	suero fetal de ternera
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GW	GW3965
IL-1 $\beta$	interleuquina-1
IL-6	interleuquina-6
iNOS	sintasa de óxido nítrico inducible
LPS	lipopolisacárido
LXR	receptor X hepático
LXRE	elemento de respuesta a LXR
MAPK	quinasas activadas por mitógenos

MCP-1	proteína quimioatrayente de monocitos-1
MMPs	metaloproteinasas de matriz
mPGES-1	prostaglandina E sintasa microsomal-1
NFκB	factor nuclear kappa B
NR	receptor nuclear
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PGE <sub>2</sub>	prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	prostaglandina F <sub>2α</sub>
PGFS	prostaglandina F sintasa
PGI <sub>2</sub>	prostaglandina I <sub>2</sub> o prostaciclina
PGIS	prostaciclina sintasa
PPAR	receptor activado por proliferador de peroxisomas
RAR	receptor de ácido retinoico
RARE	elemento de respuesta a RAR
RLU	unidad relativa de luciferasa
RT	transcripción reversa
RXR	receptor X de retinoides
RXRE	elemento de respuesta a RXR
SD	desviación estándar
SR	SR11237
TNFα	factor de necrosis tumoral α
TO	TO901317
TXB <sub>2</sub>	tromboxano B <sub>2</sub>
TXS	tromboxano sintasa
VVG	Verhoeff-Van Gieson



***ABSTRACT / RESUMEN***

---



**Abstract**

Liver X receptors (LXRs) are nuclear receptors that act as ligand-dependent transcription factors and form permissive heterodimers with other nuclear receptors named retinoid X receptors (RXR). Once they are activated by either LXR ligands or RXR ligands, these nuclear receptors can integrate both lipid metabolism and inflammatory processes by regulating the expression of genes that are implicated in these signaling pathways. In this study we show that macrophage cell lines and also primary macrophages express functional LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  isoforms. We report an inhibitory effect on the LPS-induced expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) upon treatment of macrophages with LXR ligands, either naturally-occurring, such as oxysterols, or synthetic, as GW3965 and TO901317. Downregulation of COX-2 expression is enhanced when cells are incubated with a combination of LXR plus RXR ligands. A similar inhibitory effect by these ligands was observed when analyzing the LPS-induced expression of microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 (mPGES-1). Consequently, there was a reduction in PGE<sub>2</sub> production in cells treated with LXR ligands prior to LPS stimulation. The study of the inhibitory effects of LXRs on LPS-induced expression of COX-2 and mPGES-1 has led us to determine the existence of a transcriptional interference mechanism through the modulation of the activity of transcription factors such as NF $\kappa$ B, but also Egr-1, which had not been previously associated with LXR-mediated gene repression. On the other hand, macrophages incubated with RXR or RAR (retinoid receptors) ligands, displayed an increased expression of cyclooxygenase-1 (COX-1) both at mRNA and protein levels. Induction of COX-1 via RXR/RAR is dependent on *de novo* protein synthesis, thus suggesting an indirect effect of RXR/RAR activation.

Moreover, our results show a reduction in RAW264.7 macrophages migration in response to different stimuli after LXR activation, an effect that could contribute to the anti-inflammatory actions ascribed to these nuclear receptors.

The present work has also sought to provide new insights into the effects of LXR activation *in vivo* in a model of abdominal aortic aneurysm (AAA) using ApoE<sup>-/-</sup> mice infused with angiotensin II (Ang.II) and treated with the LXR synthetic ligand TO901317. The results obtained showed a decrease in the development and severity of aortic lesions with lower expression of some pro-inflammatory genes, as well as the CD68 macrophage surface marker, in the Ang.II group treated with TO901317 in comparison with mice infused with AngII and treated with vehicle. Therefore, these data open a new field for the study of LXRs ligands as potential therapeutic agents in the control of the development and progression of abdominal aortic aneurisms.

## Resumen

Los LXR (*Liver X receptors*) son receptores nucleares que participan en la regulación de la expresión génica actuando como factores de transcripción dependientes de ligando y formando heterodímeros permisivos con otros receptores nucleares denominados RXR (*Retinoid X receptors*). Tras la activación de los heterodímeros LXR/RXR, mediada bien por la unión de ligandos específicos de LXR o bien por ligandos de RXR, estos receptores son capaces de modular la expresión de genes implicados tanto en la regulación del metabolismo del colesterol, como en el desarrollo de las respuestas inflamatorias. En el presente estudio se muestra que, tanto las líneas celulares de características monocito-macrófago empleadas, como los macrófagos primarios de ratón, expresan LXR $\alpha$  y LXR $\beta$  funcionales. Se describe un efecto inhibitorio sobre la expresión de la ciclooxygenasa-2 (COX-2), inducida por la estimulación con LPS, en macrófagos tratados con ligandos de LXR, tanto naturales como sintéticos, y de forma dependiente de dosis. Este efecto se ve incrementado tras la incubación de los macrófagos con la combinación de ligandos de LXR y de RXR, observándose un efecto cooperativo. La expresión de la sintasa de PGE<sub>2</sub> microsomal-1 (mPGES-1), inducida por LPS en macrófagos, también se ve disminuida en presencia de los ligandos de LXR empleados. Como consecuencia, se produce una menor producción de PGE<sub>2</sub> en los sobrenadantes de cultivo de las células tratadas con los agonistas sintéticos de LXR previamente a su estimulación con LPS. Los resultados obtenidos demuestran que esta reducción en la respuesta a LPS mediada por activación de receptores LXR en macrófagos implica la interferencia con la actividad de factores de transcripción como NF $\kappa$ B y Egr-1. Por otra parte, los macrófagos tratados con ligandos de RXR o de receptores de ácido retinoico (RAR) muestran una inducción en la expresión basal de la ciclooxygenasa-1 (COX-1) tanto a nivel de su ARNm como a nivel de proteína. La inducción transcripcional de COX-1 mediada por ligandos de RXR y RAR en macrófagos requiere de la síntesis *de novo* de proteínas. Los ensayos realizados muestran también una reducción en la migración de las células RAW264.7 en respuesta a diferentes estímulos por efecto del tratamiento con un ligando sintético de LXR, indicando un defecto funcional en los macrófagos mediado por activación de estos receptores nucleares que podría contribuir a sus acciones anti-inflamatorias.

El presente trabajo se ha enfocado además hacia el estudio de los efectos de la activación de receptores LXR *in vivo* sobre un modelo murino de aneurisma aórtico abdominal (AAA) que consiste en la infusión de angiotensina II (Ang.II) a ratones deficientes en la apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>). Los datos obtenidos muestran una reducción en la incidencia y severidad de las lesiones de AAA en el grupo de tratamiento con Ang.II y el ligando sintético de LXR TO901317, respecto a los ratones tratados con Ang.II y vehículo, así como una menor expresión de algunos genes pro-inflamatorios y del marcador de superficie de macrófagos CD68. De esta forma se pone de manifiesto la potencial relevancia del estudio de los efectos de los ligandos de LXR sobre el desarrollo y progresión del AAA.

## ***INTRODUCCIÓN***

---



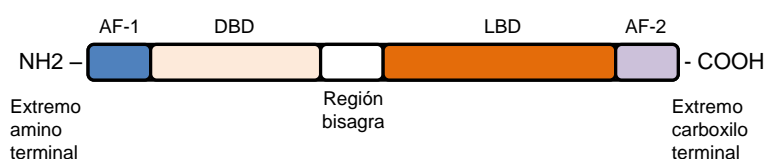
## 1.- Los receptores LXR

Los receptores LXR (*Liver X receptors*), pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, la cual agrupa una serie de proteínas que regulan la expresión de genes implicados en diversos procesos fisiológicos como el desarrollo, la reproducción y el metabolismo. Mediante análisis genómico se han identificado 48 miembros filogenéticamente relacionados y que pertenecen a esta superfamilia de receptores en humanos. Incluye receptores endocrinos clásicos que actúan como mediadores de la acción de las hormonas esteroideas, tiroideas y vitaminas liposolubles A y D<sub>2</sub> además de un gran número de receptores nucleares, considerados huérfanos, de los que se desconocen sus ligandos, genes diana o funciones fisiológicas (Barish, G.D., *et al.*, 2005; Robinson-Rechavi, M., *et al.*, 2003).

A diferencia de otros receptores, como los receptores de membrana, los miembros de la familia de receptores nucleares son capaces de regular de forma directa la transcripción génica actuando como factores de transcripción dependientes de ligando. En este sentido, estos receptores relacionan de forma directa las moléculas señalizadoras que intervienen en diferentes procesos fisiológicos con las respuestas transcripcionales.

### 1.1. Organización estructural y funcional de los receptores LXR

Los LXRs comparten la organización estructural básica con la mayoría de proteínas pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares consistente en la presencia de un dominio de unión a ADN altamente conservado, junto con dominios de unión del ligando específico. La estructura particular de estos receptores presenta un dominio AF-1 de activación independiente de ligando situado en el extremo N-terminal, un dominio de unión a ADN (DBD) que contiene dos dedos de zinc, y la región de mayor tamaño en el extremo C-terminal, donde se encuentra el dominio de unión a ligando (LBD) y un dominio AF-2 de activación dependiente de ligando (Figura A). Tanto el dominio de unión a ADN, como los dominios del extremo C-terminal, participan en la dimerización de los receptores y contienen señales de localización nuclear (NLS) (Brélivet, Y., *et al.*, 2012; Robinson-Rechavi, M., *et al.*, 2003).



**Figura A.-** Dominios estructurales de los receptores nucleares dependientes de ligando LXR

Los LXR se identificaron por primera vez en 1994 mediante ensayos de secuenciación masiva de una colección de cDNAs de hígado de rata y se caracterizaron inicialmente como receptores huérfanos debido al desconocimiento de sus ligandos naturales (Apfel, R., *et al.*, 1994). Existen dos isoformas de LXR denominadas LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ . Ambas comparten alta homología de secuencia pero se diferencian en cuanto a su localización. Mientras que la isoforma  $\beta$  se expresa en la mayoría de tejidos, LXR $\alpha$  es más abundante en algunos tejidos como hígado, tejido adiposo y macrófagos (Repa, J.J. and Mangelsdorf, D.J., 2000).

La activación de los receptores LXR depende de la unión con sus ligandos, ya sean naturales o sintéticos. En cuanto a los ligandos naturales de LXR se ha observado que diversos derivados oxidativos del colesterol agrupados bajo la denominación de oxiesteroides, entre los que se incluyen el 24(S)-hidroxicolesterol, el 22(R)-hidroxicolesterol y el 25-hidroxicolesterol, son capaces de unirse a los receptores, promoviendo su actividad reguladora de la transcripción a concentraciones fisiológicas. Por otra parte, se han desarrollado también ligandos sintéticos para LXR como GW3965 y TO901317, que se unen y activan de forma eficiente estos receptores nucleares (Janowski, B.A., *et al.*, 1999; Töröcsik, D., *et al.*, 2009). Además, en los últimos años se han sintetizado diversos ligandos isoforma o tejido-específicos que aumentan el potencial terapéutico de la activación de estos receptores (Jakobsson, T., *et al.*, 2012).

De forma similar a lo descrito para otros receptores nucleares como en el caso de los receptores de ácido retinoico (RAR), los LXR deben formar heterodímeros con los receptores RXR (*Retinoid X receptors*) para ser funcionales. Sin embargo, mientras que en los dímeros RAR/RXR los receptores RXR participan como receptores asociados silenciosos, perdiendo su capacidad para favorecer la unión de su ligando específico en ausencia del ligando de RAR, en el caso de los heterodímeros LXR/RXR se ha comprobado que existe permisividad y que, por tanto, se activa la señalización mediada por estos receptores tanto en presencia de ligandos de LXR como en presencia de ligandos de RXR como el ácido 9-cis retinoico (DiRenzo, J., *et al.*, 1997; Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M., 1995; Willy, P.J., *et al.*, 1995).

La regulación de la transcripción génica por parte de los LXR tiene lugar cuando, una vez que el receptor nuclear es activado por la unión del ligando, se une al DNA en secuencias específicas en la región promotora de genes diana, favoreciendo su transcripción. Aparte de este mecanismo denominado de trans-activación de genes, los LXR también pueden actuar como trans-represores, interfiriendo con la activación de

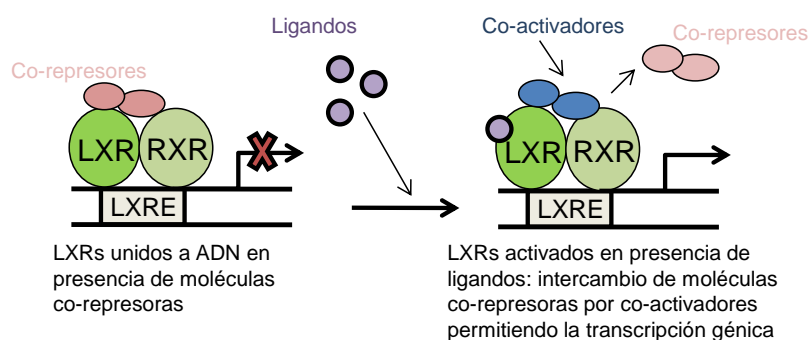


otros factores de transcripción y por lo tanto reprimiendo la activación transcripcional de ciertos genes.

## 1.2. Mecanismos de trans-activación génica mediada por receptores LXR

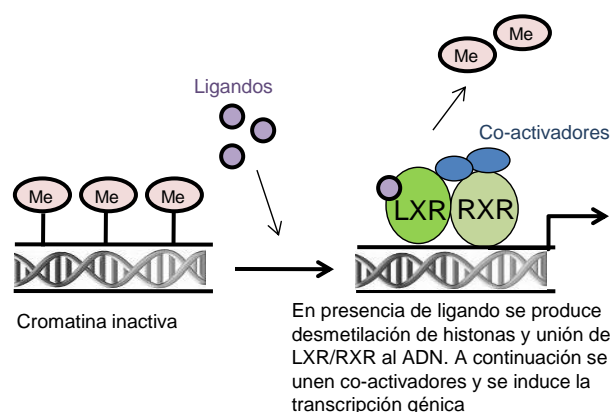
El proceso de inducción de la transcripción génica mediada por LXR tiene lugar cuando los heterodímeros LXR/RXR sufren un cambio conformacional por unión de sus ligandos, ya sean específicos para LXR o para receptores RXR. Estos receptores se unen a secuencias específicas del ADN denominadas elementos de respuesta a LXR (LXRE) que consisten en repeticiones directas de la secuencia consenso 5'-AGGTCA-3', y que comparten los elementos de respuesta para otros miembros de la familia de receptores nucleares. No obstante, los LXRE contienen 4 nucleótidos entre las repeticiones de la secuencia consenso, creando un motivo DR4 que es altamente específico para la unión de heterodímeros LXR/RXR y que por tanto confiere capacidad de unión con alta afinidad a los receptores LXR específicamente implicados en la vía de señalización mediada por LXR/RXR (Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M., 1995; Willy, P.J., *et al.*, 1995).

Según el mecanismo clásico de trans-activación, en ausencia de ligando, los heterodímeros LXR/RXR se encontrarían unidos a los LXREs formando complejos multi-proteicos con moléculas co-represoras como Ncor (*nuclear receptor co-repressor*) y SMRT (*silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptor*). Tras la unión de sus ligandos, los heterodímeros LXR/RXR sufrirían un cambio conformacional, de forma que se produciría un intercambio de las moléculas co-represoras por co-activadores como SRC-1 (*Steroid receptor co-activator*), p300 y ASC-2 (*Activating signal cointegrator-2*), lo que favorecería la inducción de la transcripción de genes diana (Figura B) (Kim, G.H., *et al.*, 2009; Phelan, C.A., *et al.*, 2008; Töröcsik, D., *et al.*, 2009).



**Figura B.-** Mecanismo clásico de trans-activación génica tras la unión del ligando a los LXRs

Además de este modelo clásico de activación génica mediada por receptores LXR, existe un modelo alternativo que describe la inducción de la expresión de determinados genes diana de LXR mediante un mecanismo de acción diferente. En este caso, en presencia de ligando se formaría un complejo de proteínas que comprendería los heterodímeros LXR/RXR y las moléculas reguladoras asociadas, junto con proteínas que producen desmetilación de histonas y cambios epigenéticos en el ADN, lo que llevaría a una mayor apertura de la estructura de la cromatina, permitiendo de esta forma la unión de los LXRs a sus elementos de respuesta y por tanto la expresión de estos genes (Figura C) (Jakobsson, T., *et al.*, 2012).



**Figura C.-** Mecanismo alternativo de trans-activación génica vía LXR

También se han descrito modificaciones post-traduccionales de los receptores LXR que afectan a su potencial como reguladores de la transcripción génica. En este sentido, modificaciones como ubiquitinación, fosforilación de residuos o modificaciones por SUMO pueden cambiar el tipo de moléculas co-reguladoras que forman el complejo multimérico con los heterodímeros LXR/RXR, modulándose de esta forma los efectos que conlleva la activación de receptores LXR (Li, X., *et al.*, 2007; Yamamoto, T., *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta los diferentes mecanismos de regulación que determinan la activación de estos receptores, los efectos y condiciones en las que los heterodímeros LXR/RXR regulan la transcripción génica variará en función de diversos factores. En primer lugar, el nivel de expresión de los propios receptores LXR y RXR, además de la concentración y tipo de ligandos endógenos, determina una mayor o menor actividad de LXR en diferentes tejidos o tipos celulares. Por otra parte, la disposición de los LXRE en los promotores de diferentes genes o la cantidad de moléculas co-reguladoras también condicionan el mecanismo de activación de LXR. Además, de forma similar a lo estudiado en otros receptores nucleares como el receptor de estrógeno (ER) (Shang, Y. and Brown,

M., 2002), una misma molécula co-reguladora como es el caso de GPS2 (*G protein pathway supressor 2*) puede actuar como co-represora o co-activadora en función del gen diana (Jakobsson, T., et al., 2009).

### **1.3. Acciones de la activación de receptores LXR en la regulación del metabolismo lipídico**

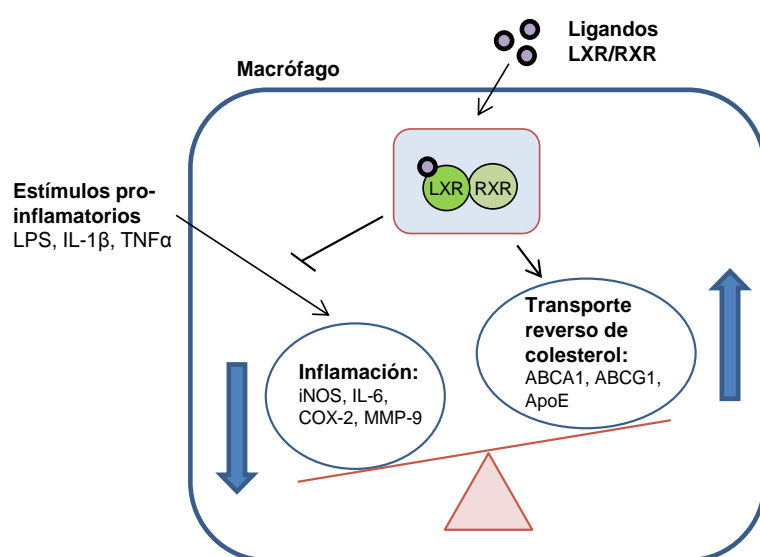
A través de sus acciones como inductores de la expresión génica, los LXRs participan en la regulación de la expresión de genes implicados en diversos procesos metabólicos que ocurren en órganos o tejidos diferentes. En este sentido, se ha descrito que los LXRs están implicados en la regulación del metabolismo del colesterol, en procesos de lipogénesis a nivel hepático (Schultz, J.R., et al., 2000) y también en el metabolismo de la glucosa en tejido adiposo (Calkin, A.C. and Tontonoz, P., 2012).

Gran parte de la investigación sobre los efectos de la activación de receptores LXR se ha centrado en su papel como reguladores del metabolismo del colesterol, transactivando un conjunto de genes que modulan el transporte, catabolismo y eliminación del colesterol. Como consecuencia de la activación de heterodímeros LXR/RXR, se produce una disminución de acúmulos de colesterol libre y se favorece su correcta eliminación. En este sentido, los agonistas de LXR favorecen la excreción hepática del colesterol y disminuyen su absorción intestinal mediante la inducción de genes diana implicados en estas vías metabólicas como ABCG5 y ABCG8 (*ATP-binding cassette transporter G5 y G8*) (Baranowski, M., 2008). También se ha descrito recientemente la participación de los LXRs en la captación de colesterol a través de la modulación de los niveles de receptor de LDLs (LDLR), regulando en este caso de forma indirecta la degradación del LDLR, mediante la inducción de la expresión de la proteína Idol (*inducible degrader of the LDLR*), capaz de añadir residuos de ubiquitina al LDLR, favoreciendo su degradación por el proteasoma (Tontonoz, P., 2011; Zelcer, N., et al., 2009).

Los macrófagos juegan un papel esencial en los primeros pasos del transporte reverso del colesterol hacia las HDLs. La activación de LXRs con agonistas específicos promueve, en estas células, un aumento del transporte reverso a través de la inducción de la expresión de transportadores de colesterol como las proteínas ABCA1 y ABCG1 (*ATP-binding cassette transporter A1 y G1*), o bien por la inducción de moléculas aceptoras de colesterol como la apolipoproteína E (ApoE) (Kennedy, M.A., et al., 2005; Laffitte, B.A., et al., 2001; Venkateswaran, A., et al., 2000).

## 2.- Acciones anti-inflamatorias de los LXRs

Además de la participación de los LXRs en la regulación de procesos metabólicos como el transporte reverso de colesterol desde los macrófagos, como se indica en el apartado anterior, los receptores LXR también participan en la regulación de otros procesos como la respuesta inmune y el proceso inflamatorio (Figura D). Su papel como moduladores de la inmunidad tiene lugar a diferentes niveles y en diferentes fases de la respuesta inmune. En general, la actividad de los receptores nucleares LXR en células del sistema inmune promueve acciones anti-inflamatorias, como la represión de la transcripción de genes inflamatorios en macrófagos activados (Liu, Y., *et al.*, 2012; Tontonoz, P. and Mangelsdorf, D.J., 2003).



**Figura D.-** Regulación coordinada de la respuesta inflamatoria y el metabolismo del colesterol por activación de receptores LXR en macrófagos

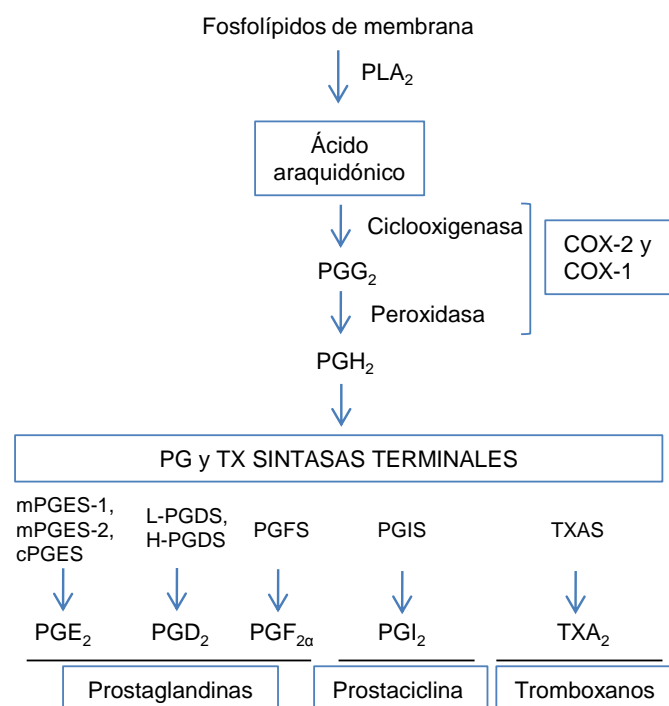
### 2.1. Expresión de genes inflamatorios en macrófagos activados

Los macrófagos juegan un papel fundamental en la respuesta inflamatoria, contribuyendo de forma esencial a la producción de citoquinas tras ser activados por distintas señales de peligro, como agentes patógenos, complejos inmunes y otras citoquinas. Como consecuencia de la activación del macrófago, se activan una serie de vías de señalización que llevan a la producción de citoquinas como IL-6, IL-8, IL-12, IL-1 $\beta$  (interleuquinas-6, 8, 12 y 1 $\beta$ ) y TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ), quimioquinas como MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1) y enzimas implicadas en la producción de mediadores inflamatorios como iNOS (sintasa de óxido nítrico inducible) o COXs (ciclooxygenasas) (Bode, J.G., *et al.*, 2012; Cassetta, L., *et al.*, 2011; Murray, P.J. and Wynn, T.A., 2011). En conjunto, estos factores inducen el reclutamiento celular, favoreciendo la expresión de moléculas de adhesión y estimulando la extravasación de plasma. Aunque los procesos inflamatorios se desencadenan de cara a la resolución de

infecciones o agresiones que causan daño tisular, la inflamación prolongada puede producir o amplificar diversas situaciones patológicas. Por este motivo los genes implicados en procesos inflamatorios se expresan bajo una fina regulación que evita respuestas inmunes desproporcionadas o dañinas.

Los prostanoides son importantes mediadores inflamatorios que incluyen prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI) y tromboxanos (TXs). Su síntesis tiene lugar a partir de fosfolípidos de membrana que generan ácido araquidónico (AA) mediante la acción de la fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>). El AA es convertido en PGH<sub>2</sub> por las ciclooxigenasas que generan la molécula intermediaria PGG<sub>2</sub> que es altamente inestable y deriva en PGH<sub>2</sub> mediante una reacción peroxidasa. Finalmente, la PGH<sub>2</sub> actúa como sustrato de las diferentes PG sintasas terminales (PGES, PGDS, PGFS y TXAS) generándose las diversas prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos (Figura E) (Simmons, D.L., *et al.*, 2004; Tilley, S.L., *et al.*, 2001; Warner, T.D. and Mitchell, J.A., 2004). La regulación de esta vía de síntesis se da principalmente a nivel de la reacción catalizada por las ciclooxigenasas, y a nivel de las PG sintasas terminales que determinan el balance final de producción de prostanoides. Existen dos isoformas de ciclooxigenasa denominadas COX-1 y COX-2. Ambas son capaces de catalizar la misma reacción, aunque difieren en la regulación de su expresión en respuesta a diferentes estímulos. Mientras que COX-1 se ha descrito clásicamente como la isoforma no-inducible y responsable de funciones de control homeostático, COX-2 participa en el desarrollo de procesos inflamatorios induciéndose su expresión bajo la influencia de diferentes estímulos (Iñiguez, M.A., *et al.*, 2003; Kang, Y.-J., *et al.*, 2007; Patrignani, P., *et al.*, 2005). Estas enzimas son dianas de los compuestos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) que ejercen sus probadas acciones anti-inflamatorias a través de la inhibición de la actividad ciclooxigenasa, y por tanto de la producción de prostanoides (Mitchell, J.A. and Warner, T.D., 2006; Roth, S.H., 2011; Takeuchi, K., 2012).

La producción de la prostaglandina inflamatoria por excelencia PGE<sub>2</sub>, viene determinada, además de por la actividad de las ciclooxigenasas, por la acción de las PGE sintasas. De las tres isoformas descritas hasta la fecha: cPGES (PGES citosólica), mPGES-2 (PGES microsomal-2) y mPGES-1 (PGES microsomal-1), es esta última la que parece tener un papel relevante en la producción exacerbada de PGE<sub>2</sub> por parte de los macrófagos durante el proceso inflamatorio. Mientras que la c-PGES y la mPGES-2 se expresan de forma constitutiva, la mPGES-1, asociada a COX-2, se induce como ésta en respuesta a estímulos pro-inflamatorios (Samuelsson, B., *et al.*, 2007).



**Figura E.-** Esquema de las reacciones principales de la vía de síntesis de los prostanoideos

## 2.2. Acciones de los LXR sobre la expresión génica en macrófagos activados

En 2003, Tontonoz y colaboradores describieron por primera vez los efectos represores de la activación de LXRs sobre la expresión de genes inflamatorios en macrófagos activados (Joseph, S.B., *et al.*, 2003). Entre otros, algunos de los genes esenciales en el proceso inflamatorio cuya expresión en macrófagos se ve inhibida tras la activación de LXRs, son aquellos que codifican para la iNOS, la COX-2, IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1, MIP1 $\beta$  (proteína inflamatoria de macrófagos-1 $\beta$ ) y MMP-9 (metaloproteínasa de matriz-9) (Joseph, S.B., *et al.*, 2003; Myhre, A.E., *et al.*, 2008; Wang, Y.Y., *et al.*, 2006). Estos receptores también pueden ejercer sus acciones anti-inflamatorias mediante la inducción de genes en macrófagos, como en el caso de la arginasa II, la cual compite por el sustrato con la iNOS, reduciéndose así la producción de NO (Marathe, C., *et al.*, 2006). Mientras que la inducción de arginasa II tiene lugar de forma directa mediante unión de LXR/RXR a elementos de respuesta LXRE situados en el promotor de este gen, la inhibición por ligandos de LXR de la expresión de genes pro-inflamatorios en respuesta a diferentes estímulos tiene lugar, de forma indirecta, mediante un mecanismo de acción de los LXRs denominado trans-represión que se discutirá más adelante.

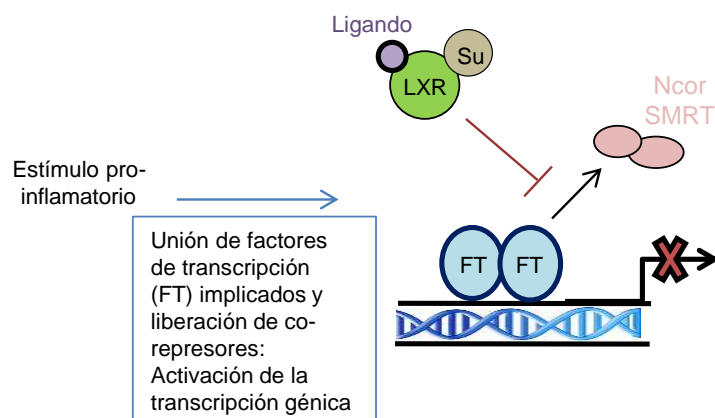
Por otro lado, la activación de LXRs promueve la supervivencia de los macrófagos en el contexto de una infección a través de la reducción de apoptosis por inducción de genes anti-apoptóticos como AIM (apoptotic inhibitor of macrophages) (Im, S.-S. and Osborne, T.F., 2011; Joseph, S.B., *et al.*, 2004). Los LXRs parecen jugar también un papel esencial en la inducción de fagocitosis de células apoptóticas por parte de los macrófagos, mediante la regulación positiva de la expresión del gen que codifica para Mer (A-Gonzalez, N., *et al.*, 2009; Kidani, Y. and Bensinger, S.J., 2012).

### **2.3. Mecanismos de represión de la expresión génica por la activación de receptores LXR en macrófagos**

El efecto trans-represor sobre la expresión de genes inducidos por estímulos pro-inflamatorios en macrófagos parece tener lugar a través de la interferencia de los LXRs activados sobre la actividad de otros factores de transcripción. Un factor esencial en la activación de genes pro-inflamatorios en macrófagos es el factor NFκB (Carmody, R.J. and Chen, Y.H., 2007; Hayden, M.S., *et al.*, 2006). De tal forma, se ha descrito que la trans-represión mediada por LXR puede darse a través de interferencia con este factor de transcripción. En este sentido se ha observado que en el caso del gen de la MMP-9, que es inducible por LPS y participa en el desarrollo de procesos inflamatorios mediante la degradación de diversos componentes de la matriz extracelular, el efecto trans-represor de LXR se pierde en ausencia de los sitios de unión NFκB de su promotor. Sin embargo, el mecanismo preciso mediante el cual los LXRs pueden interferir con la actividad de NFκB, no se conoce con precisión, habiéndose descartado en algún caso que la activación de los LXRs afecte a la activación de NFκB a nivel de la translocación hacia el núcleo o a nivel de su unión con el ADN (Castrillo, A., *et al.*, 2003).

En los últimos años se ha propuesto un modelo en el que la trans-represión génica por activación de LXRs en macrófagos tendría lugar mediante la señalización vía SUMO. Se han identificado diversos genes LXR-dependientes como iNOS y MCP-1 en los que la trans-represión tiene lugar cuando, en presencia de ligando, se produce la unión de proteínas SUMO2/3 a los heterodímeros LXR/RXR, de forma que el complejo multiproteico resultante se une al promotor de estos genes impidiendo su expresión. En macrófagos en situación basal, determinadas moléculas co-represoras como Ncor se encuentran unidas a los promotores de estos genes pro-inflamatorios impidiendo su transcripción. En respuesta a ciertos estímulos como LPS se produce la liberación de los co-represores y por tanto la inducción de su expresión. Los receptores LXR unidos a proteínas SUMO impiden la liberación del complejo de NCor produciendo de esta forma un efecto inhibitorio sobre la respuesta a LPS en estos genes (Figura F) (Ghisletti, S., *et al.*, 2009; Ghisletti, S., *et al.*, 2007).





**Figura F.-** Esquema de la posible interferencia con la transcripción génica mediada por receptores LXR modificados por proteínas SUMO

## 2.4. Regulación de los efectos anti-inflamatorios de los receptores LXR

De la misma forma que la activación de la transcripción génica mediada por LXR está altamente regulada y depende de diversos factores determinantes, el mecanismo de trans-represión por LXR también tiene lugar de forma célula-específica o incluso gen-específica. El alto nivel de regulación de este mecanismo de acción viene determinado por diversos factores como por ejemplo el tipo de ligando pro-inflamatorio que desencadena la respuesta inmune. En este aspecto, se ha comprobado que la activación de receptores LXR revierte la expresión de iNOS inducida por LPS en macrófagos, mientras que no es capaz de trans-reprimir su expresión inducida por otros estímulos pro-inflamatorios como los agonistas de TLR1/2 (Ghisletti, S., *et al.*, 2007).

Otro factor de gran influencia en el mecanismo de trans-represión por LXR, además de la abundancia de receptores y ligandos en los diferentes tipos celulares, es la regulación transcripcional propia de los genes trans-reprimibles por LXR. En este sentido, juegan un papel fundamental la participación de determinados factores de transcripción como NFκB, o de moléculas co-represoras como Ncor en la regulación de los diferentes genes.

En conclusión, la trans-represión mediada por LXR es un mecanismo de alta complejidad y diversos puntos de regulación que requiere un mayor estudio en profundidad y constituye un abordaje de gran relevancia para el desarrollo de fármacos o terapias anti-inflamatorias en el contexto de múltiples patologías. El potencial anti-inflamatorio de la activación de receptores LXR ha permitido realizar diversos ensayos de cara a comprobar la eficacia del tratamiento con ligandos de estos receptores en modelos de patologías inflamatorias como son por ejemplo, la dermatitis de contacto (Fowler, A.J.,



*et al.*, 2003) o la osteoartritis (Li, N., *et al.*, 2010). Se ha demostrado un efecto beneficioso de este tipo de tratamiento experimental por su influencia en diferentes procesos implicados en el desarrollo de las diversas enfermedades estudiadas, reduciendo la señalización inflamatoria.

### **3.- Los receptores LXR en la fisiopatología cardiovascular**

Teniendo en cuenta la implicación de LXR tanto en la regulación del metabolismo del colesterol como en la regulación de procesos inflamatorios, el estudio de los mecanismos de acción de estos receptores nucleares ha adquirido relevante importancia en el área de investigación de diversas enfermedades cardiovasculares en las que existe tanto un componente inflamatorio como una acumulación de colesterol que determinan el desarrollo de la patología (Fiévet, C. and Staels, B., 2009; Jakobsson, T., *et al.*, 2012; Tontonoz, P. and Mangelsdorf, D.J., 2003).

#### **3.1. Efectos de la activación de receptores LXR en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares**

Las primeras observaciones relevantes de que los LXRs y sus ligandos podían ejercer acciones importantes en patologías cardiovasculares derivan de los estudios que ponen de manifiesto la influencia de los LXRs y sus ligandos naturales o sintéticos en distintas fases del proceso aterosclerótico. Investigaciones realizadas en modelos de aterosclerosis en ratón apoyan la hipótesis de que ligandos de LXR pueden ser beneficiosos en el tratamiento de la aterosclerosis. El tratamiento de ratones deficientes en ApoE o en LDLR con ligandos de LXR demuestran que la activación de estos receptores tiene como consecuencia una reducción significativa de la aterosclerosis (Joseph, S.B., *et al.*, 2002b; Joseph, S.B. and Tontonoz, P., 2003; Terasaka, N., *et al.*, 2003). Aún más, resultados de experimentos de trasplante de células de médula ósea muestran que la ausencia de LXR en macrófagos lleva a un incremento de la formación de lesiones ateroscleróticas en ratones apoE<sup>-/-</sup> o LDLR<sup>-/-</sup> (Tangirala, R.K., *et al.*, 2002). Por otra parte, también se ha comprobado que la activación constitutiva de LXR $\alpha$  en ratones LDLR<sup>-/-</sup> ejerce efectos opuestos a los observados en ratones LXR<sup>-/-</sup>, reduciéndose la formación de lesiones ateroscleróticas (Lo Sasso, G., *et al.*, 2010). Si bien estas acciones antiaterogénicas de los LXRs pueden ser mediadas por sus efectos en la regulación del metabolismo de lípidos como por ejemplo a través de un incremento en la formación de HDLs y una mejora en el metabolismo del colesterol en macrófagos, no se descarta que también sea relevante la acción protectora sobre la pared arterial, vía inhibición de la respuesta inflamatoria, particularmente en macrófagos (Chao, E.Y., *et al.*, 2008).

Estudios recientes apuntan a un papel de los LXRs en diversos aspectos relacionados con la fisiopatología cardiovascular, más allá de sus acciones como reguladores del metabolismo y el transporte lipídico. Así, se ha descrito que la activación de LXRs en un modelo de sobrecarga de presión lleva a una atenuación de la hipertrofia cardíaca (Kuipers, I., *et al.*, 2010a). El mecanismo por el cual se produce este efecto no está bien definido, pero parece apuntar a la implicación de los LXRs en la regulación de varios factores que influyen en el desarrollo de la remodelación cardíaca tales como la respuesta inflamatoria y el sistema renina-angiotensina (RAS). En cardiomiocitos en cultivo, la activación de LXRs por un agonista sintético reprime la activación de NFκB mediada por angiotensina II o lipopolisacárido, lo que se traduce en una disminución de los niveles de expresión de TNFα, IL-6 y MCP-1 y de la respuesta hipertrófica de estos cultivos de cardiomiocitos (Wu, S., *et al.*, 2009).

Los LXRs son capaces de influir también en la activación del eje RAS. La vía de señalización de RAS juega un papel principal en el control de la presión sanguínea y en los procesos de remodelación cardíaca que tienen lugar tras el daño cardíaco asociado a diferentes eventos, tales como el infarto de miocardio o la miocarditis entre otros. Los resultados obtenidos en los diferentes estudios al respecto divergen en cuanto a que algunos de ellos concluyen que existe un efecto inductor sobre la expresión de renina mediado por LXR (Morello, F., *et al.*, 2005), mientras que otros estudios proponen un mecanismo represor sobre la expresión de las proteínas implicadas como renina, ACE (del inglés, *angiotensin-converting enzyme*), o incluso los receptores de angiotensina II (ATR) (Imayama, I., *et al.*, 2008; Leik, C.E., *et al.*, 2007). Estas discrepancias se han asociado a diferencias en la especie animal utilizada en los estudios, las condiciones y duración de los tratamientos con ligandos de LXR, o incluso a la existencia de mecanismos de acción clásicos (ligando-dependiente) y alternativos (ligando-independiente) mediados por los receptores LXR sobre la expresión génica (Kuipers, I., *et al.*, 2010b).

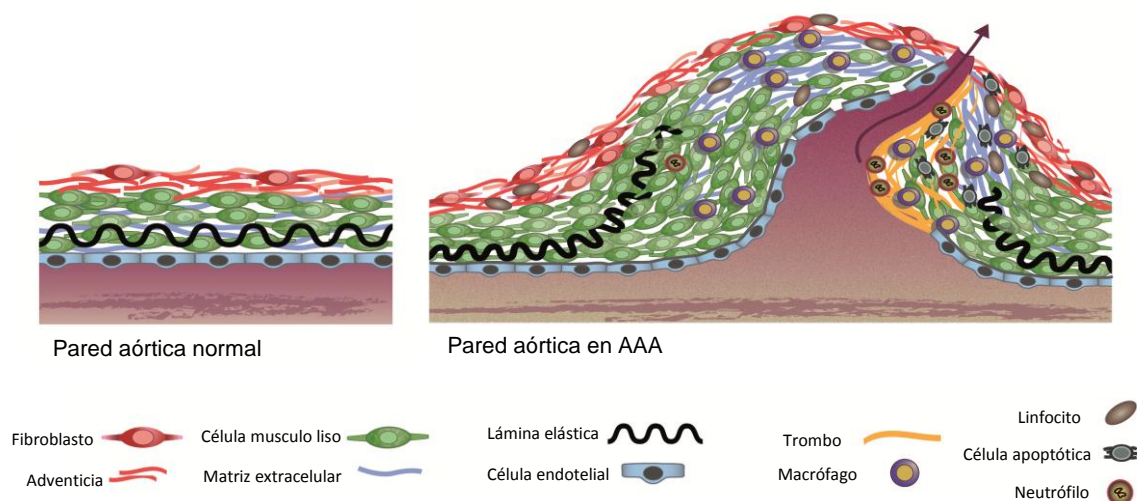
En conjunto, estos estudios ponen de manifiesto la creciente importancia del conocimiento de las acciones de la activación de LXRs en la enfermedad cardiovascular, animando al estudio del potencial de los agonistas de LXRs como agentes terapéuticos en patologías relacionadas. En particular, esta tesis doctoral incluye como uno de sus objetivos el estudio de la influencia de los LXRs en el desarrollo del aneurisma aórtico vascular (AAA).

### 3.2. El aneurisma aórtico abdominal

El aneurisma aórtico abdominal (AAA) es una enfermedad cardiovascular que se ha relacionado frecuentemente con las lesiones ateroscleróticas. Ambas patologías comparten diversos factores de riesgo como son los defectos en el metabolismo del colesterol o su acumulación en exceso. Además, el desarrollo del AAA depende en gran medida del ambiente pro-inflamatorio que se crea a nivel de las lesiones aórticas (Miyake, T. and Morishita, R., 2009). Por tanto, y teniendo en cuenta los estudios de administración *in vivo* de ligandos de LXR, ya sea en modelos de enfermedades inflamatorias como en modelos de enfermedades cardiovasculares, resulta interesante abordar la cuestión sobre cuál sería el efecto de la activación de receptores LXR sobre el desarrollo del AAA.

El AAA se consideró inicialmente como una consecuencia de las lesiones ateroscleróticas, aunque se ha demostrado que, aun compartiendo gran parte de los factores de riesgo y algunas características generales, constituye una patología independiente con características epidemiológicas e histológicas propias (Shimizu, K., *et al.*, 2006). Se define AAA como una dilatación permanente de la aorta que supera en un 50% el diámetro aórtico normal. Se produce una desestructuración y debilitamiento de la pared arterial que cursa con degradación de matriz extracelular y del entramado de elastina, apoptosis de células de músculo liso, e infiltración de células inmunes con producción de citoquinas y quimioquinas que promueven una respuesta inflamatoria prolongada. A diferencia de las placas de ateroma, la mayor parte del daño tisular asociado al aneurisma se observa a nivel de las túnica media y adventicia de la pared de la aorta. Las lesiones pueden aparecer en cualquier punto de la aorta aunque en un 80% de los casos se desarrollan a nivel abdominal, ya que en este tramo de la arteria la pared vascular es menos gruesa y existe una menor cantidad de fibras elásticas y de colágeno respecto a la aorta torácica (Annambhotla, S., *et al.*, 2008) (Figura G).

Aunque se desconocen las causas exactas de la aparición del AAA, su desarrollo se asocia a factores como la edad avanzada, sexo masculino, tabaquismo, hipertensión, hiperlipidemia y predisposición genética. Actualmente el tratamiento implica una intervención quirúrgica mediante la cual se refuerza la aorta con el fin de evitar su ruptura. En casos menos severos se limitan los principales factores de riesgo como el tabaquismo, la hipertensión o la hiperlipidemia siguiendo un tratamiento farmacológico que consiste en controlar dichos factores.



**Figura G.-** Desestructuración de la pared aórtica en lesiones de AAA

Teniendo en cuenta el envejecimiento de la población y los cambios en los hábitos de vida como la alimentación o el sedentarismo, la incidencia de patologías cardiovasculares podría aumentar respecto a la actual, que en el caso del AAA llega a alcanzar un 6-9 % en hombres mayores de 65 años de edad. Además, el tratamiento farmacológico no consigue impedir en todos los casos el desarrollo de las lesiones y la ruptura aórtica que conlleva una alta mortalidad en los pacientes de aneurisma (Aoki, H., *et al.*, 2007; Wassef, M., *et al.*, 2007). Por ello, se han llevado a cabo diferentes abordajes experimentales de cara a conocer mejor las bases moleculares de esta enfermedad. Gran parte de los estudios realizados ponen de manifiesto la importancia y el papel fundamental que juega el componente inflamatorio en el desarrollo del AAA, potenciándose de esta forma el área de investigación dedicada al conocimiento y desarrollo de fármacos que sean específicos para esta patología cardiovascular.

A pesar de que se desconoce cómo está implicado exactamente el eje renina-angiotensina en el desarrollo del AAA, existen evidencias que muestran una relación entre el RAS y esta patología, como la alta expresión de ACE en las lesiones aórticas o los modelos animales basados en la infusión de angiotensina II (Daugherty, A., *et al.*, 2006). Además, se ha confirmado dicha implicación de RAS mediante ensayos *in vivo* en los que se ha comprobado que, en el modelo de AAA que consiste en la infusión de elastasa en ratas, el tratamiento con IECAs (inhibidores de ACE) como captopril reduce la incidencia de los aneurismas (Liao, S., *et al.*, 2001).

Otro aspecto determinante en la progresión de las lesiones de aneurisma es la degradación de matriz extracelular en la pared aórtica. La matriz extracelular en el tejido aórtico consiste principalmente en un entramado de macromoléculas como elastina y colágeno que permiten soportar el estrés mecánico debido a la presión arterial. El aumento en la degradación o en la organización inapropiada de estas fibras, facilita el debilitamiento de la pared de la aorta a nivel de las lesiones pero también la migración de células inmunes y la producción de quimioquinas que promueven el establecimiento de un ambiente pro-inflamatorio en los AAA. En este proceso de degradación de la matriz extracelular intervienen proteasas de las familias de las cistein proteasas, metaloproteinasas de matriz (MMP) o serin proteasas (Hellenthal, F.A.M.V.I., *et al.*, 2009a). Aunque los mecanismos moleculares que desencadenan el aumento de degradación de matriz extracelular característica de las lesiones de AAA no se conocen con precisión, existen evidencias que confirman su participación y la relevancia de estos procesos en la progresión de la patología. Diversos estudios con animales modificados genéticamente, como por ejemplo los ratones deficientes en el inhibidor de MMPs TIMP-1, desarrollan lesiones más severas tras la inducción de aneurismas respecto a los controles *wild-type* (Eskandari, M.K., *et al.*, 2005). Así mismo, ratones quiméricos con una mutación en MT1-MMP (MMP de membrana tipo 1) en las células mieloides muestran una menor incidencia de aneurisma respecto a los controles (Xiong, W., *et al.*, 2009a). Por otro lado, se ha puesto de manifiesto un efecto beneficioso de la administración de un inhibidor de MMPs como la doxiciclina en modelos animales de AAA (Bartoli, M.A., *et al.*, 2006; Manning, M.W., *et al.*, 2003).

Otro factor esencial en el desarrollo del AAA lo constituye el componente inflamatorio asociado. En las lesiones de aneurisma se produce una infiltración de células del sistema inmune, que lleva a un aumento en la expresión de moléculas implicadas en la señalización inflamatoria (Hellenthal, F.A.M.V.I., *et al.*, 2009b). La inhibición o deficiencia en algunos de estos mediadores, como las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$  o la quimioquina MCP-1, produce una disminución en la aparición de aneurismas en los diferentes modelos animales empleados (Tieu, B.C., *et al.*, 2009; Xiong, W., *et al.*, 2009b).

Los prostanoides juegan un papel esencial como mediadores en procesos inflamatorios y también como reguladores de la función cardiovascular en general y en particular, en el desarrollo de ciertas enfermedades como la aterosclerosis (Alfranca, A., *et al.*, 2006; Iñiguez, M.A., *et al.*, 2008). En las lesiones de AAA existe una elevada expresión de proteínas implicadas en la vía de síntesis de prostanoides como la COX-2, lo que se traduce en una mayor producción de PGE<sub>2</sub> entre otras (Chapple, K.S., *et al.*,

2007; Cheuk, B.L. and Cheng, S.W., 2007). La deficiencia genética de COX-2 tiene un efecto protector sobre la aparición de aneurismas en ratones infundidos con angiotensina II (Gitlin, J.M., *et al.*, 2007). Además, el tratamiento con inhibidores selectivos de COX-2 como el Celecoxib, reduce las lesiones de aneurisma en modelos animales, en contraposición a la inhibición de COX-1 que no parece tener ningún efecto sobre las lesiones aórticas (King, V.L., *et al.*, 2006). La implicación de la enzima mPGES-1 en el AAA se ha puesto de manifiesto en ratones mPGES-1<sup>-/-</sup>, en los que se observa una menor incidencia de aneurismas inducidos por angiotensina II respecto a los controles *wild-type* (Wang, M., *et al.*, 2008a). En cuanto al papel de otros eicosanoides como los leucotrienos (LTs) en la progresión del AAA, existen estudios que confirman su implicación mediante detección de elevados niveles de LTs en las lesiones o mediante el uso de animales transgénicos (Di Gennaro, A., *et al.*, 2010; Funk, C.D., *et al.*, 2006), mientras que otros ensayos indican que estos mediadores inflamatorios no influyen sobre el desarrollo del aneurisma en modelos murinos en los que las lesiones se inducen mediante infusión de angiotensina II (Cao, R.Y., *et al.*, 2007).

Diversos estudios apuntan también a determinados factores de señalización intracelular como los factores de transcripción NFκB y NFAT (factor nuclear de células T activadas) o la quinasa JNK (c-Jun N-terminal quinasa), responsables en muchos casos de la expresión incrementada de genes inflamatorios, como posibles dianas terapéuticas para el AAA. Mediante el empleo de oligonucleótidos *decoy* que producen una inhibición de la señalización mediada por NFκB, se ha conseguido reducir la severidad de las lesiones de aneurisma en diferentes modelos animales (Miyake, T., *et al.*, 2006; Nakashima, H., *et al.*, 2004). El bloqueo farmacológico de JNK también muestra efectos beneficiosos sobre la progresión del AAA (Yoshimura, K., *et al.*, 2005). Además, se ha puesto de manifiesto la relevancia del eje calcineurina (CN) – NFAT en el desarrollo de AAA, mediante estudios en los que se demuestra que la inhibición de esta vía de señalización reduce las lesiones de aneurisma en ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II (Esteban, V., *et al.*, 2011).

El modelo propuesto para el proceso de desarrollo y progresión de la patología basado en el desarrollo de la respuesta inflamatoria asociada establece una fase inicial en respuesta a un primer estímulo que desencadena el establecimiento de un estado inflamatorio con infiltración inmune y dominado por la producción de citoquinas de tipo Th1 como IFNγ, seguido de una segunda fase que podría venir mediada por un estímulo secundario como por ejemplo alguno de los principales factores de riesgo del AAA. Esta segunda fase de la progresión del aneurisma se asocia a la degradación de la matriz

extracelular y la producción de citoquinas de tipo Th2 como IL-4 (interleuquina-4) (Schönbeck, U., *et al.*, 2002; Shimizu, K., *et al.*, 2006).

En resumen, los estudios recientes definirían el establecimiento y desarrollo del AAA como una alteración inflamatoria del sistema cardiovascular a nivel de la pared aórtica, de origen multifactorial y con una compleja fisiopatología. El diagnóstico precoz del mismo, así como la identificación de biomarcadores moleculares y el desarrollo de terapias específicas ayudaría a paliar los severos efectos de esta patología.





## **OBJETIVOS**

---



El estudio de los efectos ant-inflamatorios de la activación de receptores LXR ha adquirido gran relevancia en los últimos años en diferentes ámbitos de la investigación biomédica. Los mecanismos por los que los LXRs modulan la respuesta inflamatoria se han analizado en diversos sistemas experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, destacando de una forma particular aquellos trabajos que estudian la relación de los LXRs con enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis. A pesar de los avances realizados en el estudio de las acciones de estos receptores nucleares, aún no se conocen con precisión los mecanismos de acción por los cuales, tras la unión de sus ligandos, tienen lugar los efectos anti-inflamatorios observados en células esenciales para la función inmune como los macrófagos, si bien parecen ocurrir esencialmente a través de la modulación de la expresión génica. Permanece también por esclarecer el papel que pueden jugar los LXRs en el desarrollo de otras enfermedades cardiovasculares que comparten diversas características con la aterosclerosis, como es el caso del aneurisma aórtico abdominal (AAA).

Por ello, los principales objetivos de esta tesis doctoral han sido:

1. Estudiar las acciones de ligandos de los receptores LXR y RXR sobre la expresión de genes implicados en el proceso inflamatorio en macrófagos, con especial atención a sus efectos sobre la expresión de genes responsables de la producción de prostanoides como las ciclooxigenasas COX-2 y COX-1, y la sintasa mPGES-1.
2. Estudiar el mecanismo por el cual los receptores LXR y RXR modulan la expresión de dichos genes en macrófagos, analizando la existencia de mecanismos de interferencia con la actividad de factores de transcripción.
3. Determinar los efectos de la activación de receptores LXR sobre la migración de macrófagos.
4. Analizar los efectos del tratamiento con ligandos del receptor LXR sobre el desarrollo y progresión de las lesiones de aneurisma aórtico abdominal en un modelo experimental en ratones.



## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

---



## 1.- Materiales

### 1.1. Modelos animales

- Ratones C57BL/6: Para la obtención de células primarias de ratón se utilizaron ratones con fondo genético C57BL/6J adquiridos a Harlan Laboratories.
- Ratones ApoE<sup>-/-</sup>: Para el modelo animal de aneurisma aórtico abdominal se utilizaron ratones deficientes en el gen de la apolipoproteína E con fondo genético C57BL/6J (C57/6J-Apoe<sup>tm1Unc</sup>) adquiridos a “The Jackson Laboratory”.

Estos animales han estado estabulados en el animalario del CBMSO, con nº de registro 28079-19A, el cual cuenta con un nivel de contención y bioseguridad adecuado de acuerdo a la legislación vigente. Todos ellos se mantuvieron alimentados a libre acceso con dieta estándar, con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad en el animalario. Los procedimientos realizados cuentan con el visto bueno del responsable de bienestar animal del CBMSO y la aprobación del comité de ética para la investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (CEI-27-656). El investigador responsable del proyecto y director de la tesis doctoral, Dr. Miguel A. Iñiguez Peña, dispone de la certificación oportuna para la experimentación animal en las categorías B y C otorgada por la Comunidad de Madrid. En cuanto a la doctoranda, también cuenta con experiencia en manipulación de animales habiendo realizado el “Curso de capacitación para experimentación animal (categoría B)” organizado por el Gabinete Veterinario de la UAM y los Vicedecanatos de Investigación de las Facultades de Ciencias y Medicina de la UAM para obtener la correspondiente acreditación, a finales de 2009.

### 1.2. Líneas celulares y cultivos primarios

- Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares de macrófagos de ratón RAW264.7 y J774, y la línea celular de monocitos humanos THP-1. Estas líneas celulares se cultivaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo RPMI (RPMI 1640, Invitrogen Life Technologies) completo [conteniendo 2 mM L-glutamina, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, gentamicina (1000 U/ml), penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml)] suplementado con 5% de suero fetal de ternera (FCS, BioWithaker).

- Macrófagos peritoneales de ratón

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron tras la inyección de 1 ml de tioglicolato (10% p/v, DIFCO) en la cavidad peritoneal del ratón. Transcurridos 4 días, se extrajeron las células presentes mediante el lavado peritoneal con PBS frío. Las células obtenidas se sembraron en placas de cultivo durante 4 horas, tras lo cual se retiraron las células en suspensión. Las células adheridas, esencialmente macrófagos, se cultivaron a 37°C en

medio RPMI completo, suplementado con 5% de FCS o con 2% de FCS, durante los diferentes tratamientos experimentales.

- Macrófagos derivados de médula ósea

La médula ósea de los ratones se extrajo mediante el lavado del canal medular de fémures y tibias con medio DMEM (Invitrogen Life Technologies) suplementado con 10% de FCS. La diferenciación a macrófagos se realizó mediante el cultivo a 37°C de las células obtenidas de la médula ósea, durante 7 días en medio DMEM completo con 10% de FCS suplementado con 10% de LCM (*leukocyte-conditioned medium*) que contiene M-CSF, obtenido del sobrenadante de cultivo de células L929. Durante la diferenciación se retiraron las células no adheridas cada 2 días. Tras los 7 días de diferenciación, se procedió a la realización de los distintos tratamientos experimentales.

Las células se estimularon con lipopolisacárido bacteriano (LPS) de *Escherichia coli* 026:B6 (2 µg/ml, Sigma) en medio completo con 2% de FCS. La incubación de las células con los ligandos de LXR TO901317 y GW3965 (0,1 a 2,5 µM) o 25-hidroxicolesterol (1 a 15 µM), ligandos de RXR ácido 9-cis retinoico y SR11237 (0,1 a 2,5 µM) o ligandos de RAR ácido *all-trans* retinoico (0,1 a 2,5 µM), se realizó una hora antes de su estimulación con LPS.

### 1.3. Anticuerpos y reactivos

#### 1.3.1. Anticuerpos

Especificidad	Características / Referencia	Origen
LXRα	Anticuerpo policlonal / sc-1202	Santa Cruz Biotechnology
LXRβ	Anticuerpo policlonal / sc-1001	Santa Cruz Biotechnology
COX-1	Anticuerpo monoclonal / ALX-804-030	Alexis Biochemicals
COX-2	Anticuerpo monoclonal / 610203	BD Transduction Laboratories
Egr-1	Anticuerpo policlonal / sc-189	Santa Cruz Biotechnology
ERK	Anticuerpo policlonal / sc-93	Santa Cruz Biotechnology
p-ERK	Anticuerpo policlonal / 9101	Cell Signaling Technology
β-actina	Anticuerpo policlonal / sc-1616	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ratón conjugado con peroxidasa	Anticuerpo secundario / 1858413	Pierce
Anti-conejo conjugado con peroxidasa	Anticuerpo secundario / 1858415	Pierce
Anti-cabra conjugado con peroxidasa	Anticuerpo secundario / A5420	Sigma-Aldrich



## 1.3.2. Reactivos

Nombre	Descripción / Referencia	Origen
LPS	Lipopolisacárido de E.Coli 026:B6 / L8274	Sigma-Aldrich
25-HC	25-hidroxicolesterol (agonista LXR) / H1015	Sigma-Aldrich
TO901317	Agonista LXR / 71810	Cayman Chemical
GW3965	Agonista LXR / G6295	Sigma-Aldrich
9cisRA	Ácido 9-cis retinoico (agonista RXR/RAR) / R4643	Sigma-Aldrich
SR11237	Agonista RXR / 3411	Tocris bioscience
ATRA	Ácido <i>all-trans</i> retinoico (agonista RAR/RXR) / R2625	Sigma-Aldrich
DMSO	Dimetil sulfóxido / D2650	Sigma-Aldrich
Ang. II	Angiotensina II / A9525	Sigma-Aldrich
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1 / 479-JE	R&D Systems
PGE <sub>2</sub> EIA Kit	Kit de EIA para la medición de PGE <sub>2</sub> / 514010	Cayman Chemical
PGF <sub>2α</sub> EIA Kit	Kit EIA para la medición de PGF <sub>2α</sub> / 516011	Cayman Chemical
TXB <sub>2</sub> EIA Kit	Kit EIA para la medición de TXB <sub>2</sub> / 519031	Cayman Chemical
Jetprime	Reactivo de transfección / 114-15	Polyplus transfection
RNA later	Reactivo para preservación de ARN / R0901	Sigma-Aldrich
CHX	Cicloheximida / C1988	Sigma-Aldrich
Act.D	Actinomicina D / A9415	Sigma-Aldrich
BSA	Albúmina de suero bovino / A7906	Sigma-Aldrich
Carboximetilcelulosa	Emulsionante para sondaje gástrico / C9481	Sigma-Aldrich
Eukitt	Medio de montaje para histología / 03989	Fluka
Paraformaldehído	Solución de fijación / HT501128	Sigma-Aldrich
Solución de Bouin	Solución de fijación para tinciones histológicas / HT101128	Sigma-Aldrich
Kit Masson-Goldner	Kit de tinción de Masson para histología / 1.00485	Merck
Accustain Elastic Stain	Kit de tinción de lámina elástica para histología / HT25	Sigma-Aldrich

## 1.4. Oligonucleótidos

### 1.4.1. PCR convencional:

Nombre	Secuencia (5'-3')	Origen
COX-1 <i>sense</i> (h)	GAGCGTCAGTATCAACTGCG	Invitrogen
COX-1 <i>asense</i> (h)	ATTGGAACTGGACACCGAAC	Invitrogen
GAPDH <i>sense</i> (h)	CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA	Invitrogen
GAPDH <i>asense</i> (h)	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC	Invitrogen
LXR $\alpha$ <i>sense</i> (h)	AGGACACACTCCTCCCGCATG	Sigma-Aldrich
LXR $\alpha$ <i>asense</i> (h)	CTTCAGAACCCACAGAGATCCG	Sigma-Aldrich
ABCA1 <i>sense</i> (h)	CTCAGAGGTGGCTCTGATGAC	Sigma-Aldrich
ABCA1 <i>asense</i> (h)	GTGATTGACCACCCATACAGCAA	Sigma-Aldrich
ABCG1 <i>sense</i> (h)	CGCATCTCACTGTGCAGGAG	Sigma-Aldrich
ABCG1 <i>asense</i> (h)	CAAAGAAAAGGGTTCACCTCG	Sigma-Aldrich
LXR $\alpha$ <i>sense</i> (r)	TGGAGTCAGCAGAGCCTACAGC	Sigma-Aldrich
LXR $\alpha$ <i>asense</i> (r)	CTTCTGACAGCACACTCCTCC	Sigma-Aldrich
LXR $\beta$ <i>sense</i> (r)	AAGCAGGTGCCAGGGTTCTTG	Sigma-Aldrich
LXR $\beta$ <i>asense</i> (r)	AAGCAGGTGCCAGGGTTCTTG	Sigma-Aldrich
RXR $\alpha$ <i>sense</i> (r)	TCCAACGGGTCGAGGCTCCAT	Sigma-Aldrich
RXR $\alpha$ <i>asense</i> (r)	GGGCTCGACAGCAAGCTCGG	Sigma-Aldrich
COX-1 <i>sense</i> (r)	TGTTCACTTCTGGCCCAACAGCT	Sigma-Aldrich
COX-1 <i>asense</i> (r)	AGCGCATCAACACGGACGCCTGTT	Sigma-Aldrich
CCL9 <i>sense</i> (r)	TGGCATATCTGGCTTTGTCA	Sigma-Aldrich
CCL9 <i>asense</i> (r)	ATGGCTGTAGCTCAAGATGGT	Sigma-Aldrich
SP-1 <i>sense</i> (r)	TTACACGTTCCGACGAGCTTCAGA	Sigma-Aldrich
SP-1 <i>asense</i> (r)	TAATGGACTGCAGCTCTGTACCT	Sigma-Aldrich
$\beta$ -actina <i>sense</i> (r)	CTCTTTGATGTCACGCACGATTTT	Invitrogen
$\beta$ -actina <i>asense</i> (r)	GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA	Invitrogen

(h) humano; (r) ratón

## 1.4.2. PCR cuantitativa:

Nombre	Referencia	Origen
COX-1 (r)	Mm00477214_m1	Applied Biosystems
mCOX-2 (r)	Mm00478374_m1	Applied Biosystems
mPGES-1 (r)	Mm00452105_m1	Applied Biosystems
ABCA1 (r)	Mm01350760_m1	Applied Biosystems
ABCG1 (r)	Mm01348250_m1	Applied Biosystems
Egr-1 (r)	Mm00656724_m1	Applied Biosystems
IL-6 (r)	Mm00446190_m1	Applied Biosystems
IL-1 $\beta$ (r)	Mm00434228_m1	Applied Biosystems
TNF $\alpha$ (r)	Mm00443258_m1	Applied Biosystems
MCP-1/CCL2 (r)	Mm99999056_m1	Applied Biosystems
CD68 (r)	Mm00839636_m1	Applied Biosystems
CD4 (r)	Mm00442754_m1	Applied Biosystems
CD8 (r)	Mm01182107_g1	Applied Biosystems
18S	Hs99999901_s1	Applied Biosystems

## 1.5. Plásmidos

## 1.5.1. Plásmidos reporteros

- COX2-luc (p2-1900): incluye la región de -1796 a +104 (desde el origen de transcripción) del gen de la COX-2 humana clonada en el plásmido pXP2 (Íñiguez, M.A., *et al.*, 2000).
- COX1-luc (p1-1006): incluye la región de -899 a +24 del gen de la COX-1 humana clonada en el plásmido pXP2 (Íñiguez, M.A., *et al.*, 2000).
- mPGES1-luc: contiene la región de -631 a -1 del gen de la mPGES-1 humana clonada en el plásmido pGL3 basic (Deckmann, K., *et al.*, 2010).
- Egr1-luc (Egr1-Pro36-luc): contiene dos elementos de reconocimiento de Egr-1 insertados frente al promotor mínimo de la prolactina. Cedido por la Dra. Ana Pérez-Castillo (Instituto de investigaciones biomédicas, Madrid) (Crosby, S.D., *et al.*, 1991).
- NF $\kappa$ B-luc (pNF3ConA-luc): contiene tres copias de la secuencia  $\kappa$ B consenso del promotor de la cadena  $\kappa$  de las inmunoglobulinas delante del promotor mínimo de la conalbúmina. Cedido por el Dr. F. Arenzana-Seisdedos (Instituto Pasteur, Paris, Francia) (Arenzana-Seisdedos, F., *et al.*, 1993).

- LXRE-luc (pTK3xLXRE-luc): contiene 3 elementos consenso de unión de LXR delante del promotor de la timidina quinasa. Cedido por el Dr. A. Castrillo (Instituto de investigaciones biomédicas, Madrid) (Marathe, C., *et al.*, 2006).
- RXRE-luc (pTK-CRBPII-luc): contiene 5 copias del elemento RXRE presente en el promotor del gen de la proteína celular de unión de retinol II (CRBPII) delante del promotor de la timidina quinasa. Cedido por el Dr. D.J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, California, US) (Mangelsdorf, D.J., *et al.*, 1991).
- RARE-luc ( $\beta$ 2RARE-TK-luc): contiene el elemento de respuesta a ácido retinoico (RARE) presente en la región promotora del receptor RAR $\beta$ 2 delante del promotor de la timidina quinasa (de The, H., *et al.*, 1990).

### *1.5.2. Plásmidos de expresión*

- pcDNA3: vector de clonaje para la expresión de proteínas en eucariotas bajo la regulación del promotor del citomegalovirus (CMV) (Invitrogen).
- pLXR $\alpha$  (pCMX-hLXR $\alpha$ ): vector de expresión de LXR $\alpha$  de humano. Cedido por el Dr. D.J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, California, US) (Mangelsdorf, D.J., *et al.*, 1992).
- pRXR $\alpha$  (pCMX-mRXR $\alpha$ ): vector de expresión de RXR $\alpha$  de ratón. Cedido por el Dr. D.J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, California, US) (Mangelsdorf, D.J., *et al.*, 1992).

## **2.- Métodos**

### **2.1. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR**

Se aisló ARN total de los cultivos celulares mediante el kit de extracción “*Absolutely RNA Miniprep Kit*” (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de la extracción de ARN a partir de tejidos de ratón conservados a 4°C en solución *RNA later* se procedió a su homogeneización con un homogeneizador *Polytron* en reactivo Trizol (Invitrogen) y se siguió el protocolo indicado por el proveedor.

El análisis de la expresión génica se realizó mediante *RT-PCR*, obteniendo en primer lugar ADNc mediante transcripción reversa (RT, MuLV Reverse Transcriptase, Roche) y posteriormente llevando a cabo reacciones en cadena de la polimerasa (*PCR*) (AmpliTaQ DNA polimerase, Roche) utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen, descritos en el apartado de Materiales. Las reacciones de *PCR* se llevaron a cabo según el siguiente esquema: 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C, de 25 a 35 ciclos consistentes

en desnaturalización de 45 segundos a 94 °C, anillamiento de 45 segundos a 55-65 °C, y extensión durante 1 min a 72 °C, finalizando con 10 minutos a 72 °C. Los ADNs amplificados tras la PCR se visualizaron mediante separación electroforética en geles de agarosa al 1,5% y tinción con bromuro de etidio.

Para la cuantificación de la expresión génica se realizaron *RT-PCRs* cuantitativas en tiempo real utilizando el kit “*High Capacity cDNA Archive Kit*” (Applied Biosystems) para la transcripción reversa del ARNm, y el kit “*Taqman Universal PCR Master Mix*” para la amplificación. Los ensayos de *PCR cuantitativa* se llevaron a cabo empleando las sondas específicas para cada gen detalladas en el apartado de Materiales, y se realizaron en el servicio de genómica del Parque Científico de Madrid en un equipo ABI Prism 7900 HT. La cuantificación de la expresión de ARNm se realizó comparando el ciclo umbral de expresión ( $\Delta\Delta C_t$ ) de las muestras experimentales con respecto al de la muestra de referencia, siguiendo las instrucciones del fabricante (SDS 2.1 software, Applied Biosystems). Todas las muestras fueron ensayadas por triplicado y normalizadas por la expresión del gen endógeno 18S. En las gráficas los datos están expresados en forma de veces de inducción con respecto a la muestra control o de referencia.

## **2.2. Inmunodetección de la expresión de proteínas mediante *Western Blot***

Los extractos celulares se obtuvieron mediante la lisis con tampón Igepal (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Igepal) al que se añadieron los inhibidores de proteasas aprotinina, leupeptina y pepstatina (10 µg/ml), y PMSF (*phenyl-methylsulphonyl fluoride* 0,5 mM). La cantidad de proteína total en los extractos se cuantificó mediante ensayos de ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Scientific). A continuación se separaron 30 µg de proteína por muestra mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con una solución de TBS (20mM Tris-HCl pH 7,6, 137mM NaCl) con 0,1% Tween (TBST) y 5% de leche desnatada en polvo durante 1,5 horas. En el caso de las membranas utilizadas para detectar la expresión de ERK y pERK la solución de bloqueo se preparó con BSA 5% en TBST. Transcurrido este tiempo se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (ver apartado de Materiales), en la misma solución de bloqueo durante 18 horas a 4°C. Después, se lavó la membrana con TBST y se incubó con el anticuerpo secundario específico acoplado a peroxidasa diluido 1/1000 en la solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron dos lavados más de la membrana con TBST y un último lavado con TBS. Finalmente se visualizaron las bandas mediante el método de quimioluminiscencia “*Supersignal Substrate Detection System*” (Thermo Scientific) en

películas autorradiográficas, las cuales se densitometraron utilizando el software Image J (National Institutes of Health) para cuantificar la densidad óptica (D.O.) de las bandas y para su posterior normalización por la expresión de  $\beta$ -actina en cada una de las muestras. Los resultados se muestran en veces de inducción respecto a la muestra de referencia.

### **2.3. Transfecciones transitorias y actividad luciferasa**

La actividad transcripcional de los diferentes plásmidos de secuencias promotoras acopladas al gen de la luciferasa se analizó mediante transfecciones transitorias en células RAW264.7 o THP-1. Las transfecciones se realizaron utilizando el reactivo Jetprime (Polyplus transfection) y siguiendo las instrucciones del fabricante. En general, se transfectaron cantidades variables de ADN entre 0,7  $\mu$ g y 1  $\mu$ g por cada  $5 \times 10^5$  células utilizando 2,25  $\mu$ g del reactivo Jetprime diluido en medio RPMI sin antibióticos y suplementado con 0,5% de FCS. En los experimentos de co-transfección con plásmido reportero junto con plásmidos de expresión se corrigió la cantidad total de ADN transfectado con un vector de expresión carente de un ADNc clonado (vector vacío, pcDNA3).

Las células transfectadas se incubaron a 37°C durante un mínimo de 4 horas tras las cuales se procedió a estimular el cultivo con los diferentes tratamientos indicados. Finalmente, se lisaron las células en 40  $\mu$ l de tampón de lisis comercial (*Luciferase Assay System*, Promega E1500) y se midió la actividad luciferasa (RLUs, *relative light units*) por muestra en un luminómetro “Monolight 2010” (Analytical Luminescence Laboratory) tras la incubación de 20  $\mu$ l de lisado con el sustrato luciferina. Los valores obtenidos se normalizaron por la cantidad de proteína por muestra determinada mediante ensayo BCA. Los experimentos de transfección se realizaron un mínimo de tres veces, llevándose a cabo triplicados de cada punto experimental. Los resultados obtenidos se muestran como actividad luciferasa en veces de inducción (RLUs por mg de proteína en la muestra experimental / RLUs por mg de proteína en la muestra control)  $\pm$  SD.

### **2.4. Medición de prostanoïdes**

El análisis de la cantidad de prostanoïdes ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y  $\text{TXB}_2$ ) en el medio de cultivo de células RAW264.7 tratadas con los diferentes estímulos indicados se realizó mediante inmuno-ensayos competitivos con kits EIA (Cayman). Los sobrenadantes de los cultivos celulares se analizaron por triplicado siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 2.5. Ensayos de migración celular *in vitro*:

Las células RAW264.7 se cultivaron a 37°C durante 18 horas en medio RPMI completo suplementado con 2% de FCS y en presencia del ligando TO901317 o vehículo (DMSO) a las concentraciones indicadas en los diferentes puntos experimentales. A continuación se incubaron las células en placas de cultivo permeables “*transwell*” (Costar 3421, Corning Inc.) con membranas de un diámetro de poro de 5 µm. En el caso de los experimentos de activación con LPS, éste se añadió en la parte superior del soporte, durante 2 horas antes de analizar la capacidad de migración de las células en respuesta a RPMI-2% FCS, RPMI-5%FCS o RPMI más 50 ng/ml de MCP-1/CCL2, dispuestos como quimioatrayentes en la parte inferior de la placa *transwell*.

La migración se mantuvo durante 5 horas, tras las cuales se eliminaron las células de la parte superior del soporte, mientras que aquellas adheridas a la parte inferior del filtro se fijaron con PBS con 4% de formaldehído. La cuantificación de las células migradas en cada caso se realizó mediante tinción con una solución de 0,5% de cristal violeta en metanol al 50% durante 20 minutos, tras los cuales se tomaron fotos de 6 campos distintos por punto utilizando un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd (SPOT RT Slider). Las imágenes de los experimentos realizados por triplicado se analizaron con el software Image J (National Institutes of Health). Los resultados se muestran como Migración relativa (nº de células migradas en la muestra / nº células migradas en el control), en veces de inducción con respecto a la muestra de referencia.

## 2.6. Modelo murino de aneurisma aórtico abdominal

Para la generación de lesiones de AAA se utilizaron ratones macho ApoE<sup>-/-</sup> de tres a cuatro meses de edad. Tras anestesia con una mezcla de ketamina / xilacina (83/6 mg por kg peso) inyectada intra-peritonealmente, se les implantó subcutáneamente en la zona dorsal, una bomba osmótica Alzet 2004 previamente incubada durante 18 horas a 37°C en solución salina y cargada con angiotensina II o solución salina según el grupo experimental. La incisión realizada a nivel dorsal se cerró mediante una grapadora quirúrgica (Fine Science Tools 12031-07), y los ratones se supervisaron hasta la completa eliminación de la anestesia. La cantidad de Ang.II infundida fue de 0,8 a 1 µg/min/Kg de peso del animal, y se mantuvo durante 28 días.

En el caso de los tratamientos con TO901317 *in vivo*, el ligando, que se disolvió en DMSO y se preparó en carboximetilcelulosa de viscosidad media al 0,75% (Sigma-Aldrich C5013), fue administrado a los ratones mediante sondas gástricas de calibre 20G (Fine Science Tools 18061-20). El tratamiento se inició un día antes de la implantación de

la bomba osmótica Alzet 2004 y se continuó durante los 15 días que se mantuvo la bomba osmótica. Finalizados los tratamientos correspondientes, los animales se sacrificaron mediante CO<sub>2</sub> y se extrajeron las aortas u otros tejidos, para su posterior análisis. El diámetro de las aortas se determinó mediante un calibre digital electrónico (0-150 mm  $\pm$  0,03). Aquellos tejidos destinados a la extracción de ARNm se conservaron en *RNA later* (Sigma-Aldrich) a 4°C hasta su procesamiento. El análisis histológico mediante tinciones se describe en la sección siguiente.

## **2.7. Tinciones histológicas de secciones de la aorta**

La región supra-renal de las aortas de los ratones ApoE<sup>-/-</sup> utilizados en estos experimentos se embebieron en parafina tras lo cual se realizaron cortes en secciones transversales de 5  $\mu$ m de grosor (Servicio de Histología CNB). Para el análisis histológico de las muestras de aorta se eliminó el excedente de parafina de los cortes mediante su incubación a 37°C y se procedió a rehidratarlos mediante inmersión en alcoholes de porcentaje decreciente (del 100% al 70%). Los cortes se fijaron con solución de Bouin (Sigma-Aldrich HT101128-4L) y se procedió con la tinción específica según fuera tinción tricrómica de Masson o Tinción de elástica Verhoeff-Van Gieson, siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, los cortes se deshidrataron tras inmersión en alcoholes de % creciente (70% al 100%) y se montaron las preparaciones en medio de montaje Eukitt (Fluka) antes de su análisis utilizando un microscopio Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd (SPOT RT Slider). En las preparaciones teñidas siguiendo el protocolo de Masson se observan los núcleos celulares y el tejido muscular en pardo/rojo, y el tejido conectivo y las fibras elásticas en verde/azul. Por otra parte, en los cortes de aorta teñidos con tinción específica para lámina elástica se observan en marrón/negro la fibra elástica y los núcleos celulares, en rosa los tejidos con colágeno, y en amarillo otros componentes tisulares.

## **2.8. Análisis estadístico**

Los datos experimentales obtenidos por triplicado se expresan como media  $\pm$  SD y su análisis se realizó utilizando el software GraphPad5. Se compararon las varianzas de los diferentes grupos mediante ANOVA y se aplicó la corrección de Bonferroni. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.



## ***RESULTADOS***

---



## 1.- Efectos de la activación de receptores LXR sobre la expresión génica en macrófagos

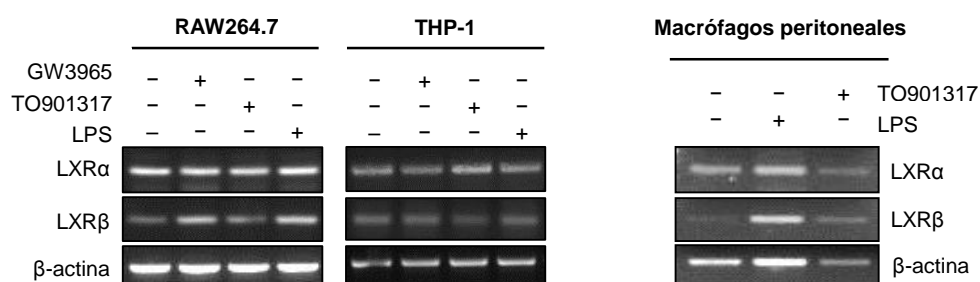
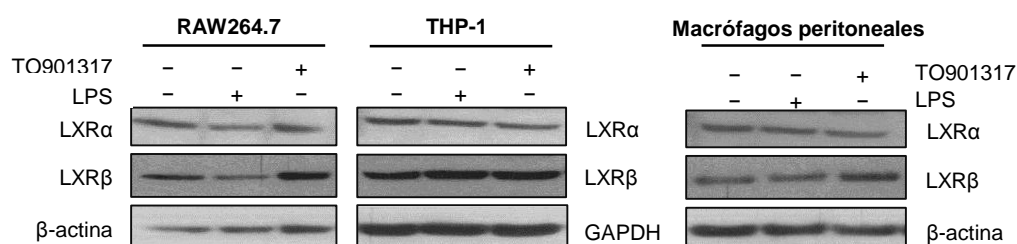
El desarrollo de los procesos inflamatorios determina en gran medida la resolución o exacerbación de las respuestas celulares que tienen lugar tanto en situaciones fisiológicas como en multitud de situaciones patológicas. La reciente descripción de los receptores LXR como reguladores, no sólo de las vías de metabolismo de colesterol, sino también de las vías de señalización que tienen lugar en la respuesta inflamatoria, ha hecho que el estudio de estos receptores nucleares adquiera relevancia en cuanto al análisis de los mecanismos de acción a través de los cuales ejercen sus efectos anti-inflamatorios (Hong, C. and Tontonoz, P., 2008).

En el contexto inflamatorio, ciertos tipos de células del sistema inmunitario como los macrófagos juegan un papel principal. En presencia de determinados estímulos activadores, como el LPS, se desencadena una serie de cascadas de señalización intracelular que llevan a la migración de células al foco inflamatorio y a la producción de mediadores como citoquinas, quimioquinas y prostanoïdes, entre otros. La regulación de la expresión de enzimas como la COX-2 y la mPGES-1 es determinante para el balance final de producción de prostanoïdes como la PGE<sub>2</sub>, y por tanto, para el desarrollo de las respuestas inflamatorias (Linton, M.F. and Fazio, S., 2004; Tilley, S.L., *et al.*, 2001).

En este sentido, uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido el estudio del mecanismo de trans-represión de genes inflamatorios por los receptores LXR en macrófagos, usando como modelos experimentales las líneas celulares RAW264.7 y THP-1, así como macrófagos peritoneales de ratón.

### 1.1. Expresión de receptores LXR funcionales en macrófagos

Con el fin de determinar la presencia y funcionalidad de los receptores LXR en los sistemas celulares en los que se realizará este estudio, analizamos en primer lugar la expresión de estos receptores mediante ensayos *RT-PCR* para determinar los niveles de ARNm, y mediante *Western blot* para el estudio de los niveles de proteína, tanto en células RAW264.7 y THP-1, como en macrófagos peritoneales de ratón. Los resultados obtenidos muestran que ambas isoformas (LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ ) presentan niveles basales de ARNm (Figura 1A) y de proteína (Figura 1B), tanto en las líneas celulares tipo monocito/macrófago, ya sean de ratón (RAW264.7) o de humano (THP-1), así como en los macrófagos peritoneales de ratón.

**A****B****Figura 1: Expresión de receptores LXR en macrófagos**

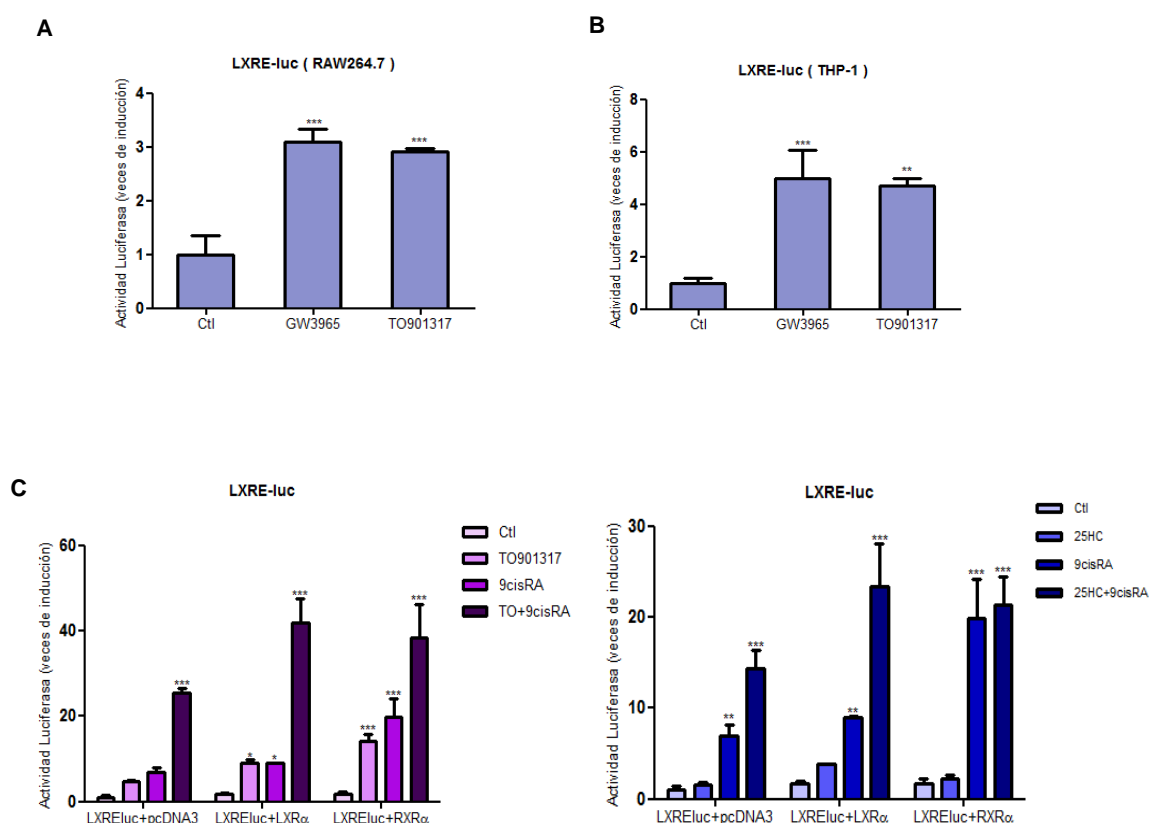
Se trataron células RAW264.7, THP-1 y macrófagos peritoneales de ratón según se indica, con LPS (2 µg/ml) y ligandos de los receptores LXR (TO901317 o GW3965, a 1 µM) y se extrajo ARNm y proteína. La expresión de las isoformas α y β de los receptores LXR fue analizada en los distintos tipos celulares mediante *RT-PCR* (**A**) y mediante *Western blot* (**B**).

Los receptores LXR actúan como factores de transcripción en respuesta a sus ligandos, permitiendo la transactivación de genes que contienen elementos de respuesta (LXRE) en su región promotora (Castrillo, A. and Tontonoz, P., 2004). De esta forma, la funcionalidad de los receptores, en cuanto a su capacidad para activar elementos de respuesta a LXR en el ADN, se analizó mediante la determinación de los efectos de los ligandos sintéticos de LXR TO901317 y GW3965 sobre un plásmido (LXRE-luc) en el que la expresión del gen de la luciferasa está bajo el control de elementos de respuesta a LXR. Tanto en células RAW264.7 (Figura 2A), como en células THP-1 (Figura 2B) transfectadas transitoriamente, la actividad luciferasa dependiente de LXRE aumenta tras el tratamiento con estos ligandos, poniendo de manifiesto la funcionalidad de los receptores LXR endógenos a este nivel.

Estos receptores nucleares forman heterodímeros con el receptor RXR para ejercer su función de regulación sobre la expresión génica (Edwards, P.A., *et al.*, 2002). En células RAW264.7 co-transfectadas transitoriamente con la construcción LXRE-luc junto con plásmidos de expresión para los receptores LXRα, RXRα o un vector vacío,

tanto el ligando sintético de LXR TO901317 como el derivado de colesterol 25-hidroxicolesterol (25HC) fueron capaces de inducir la expresión dependiente de sitios LXRE (Figura 2C). Además, el ligando de RXR 9cisRA, también fue capaz de inducir la actividad luciferasa dependiente de este elemento de respuesta, siendo mayor en células transfectadas con un vector de expresión de RXR $\alpha$ .

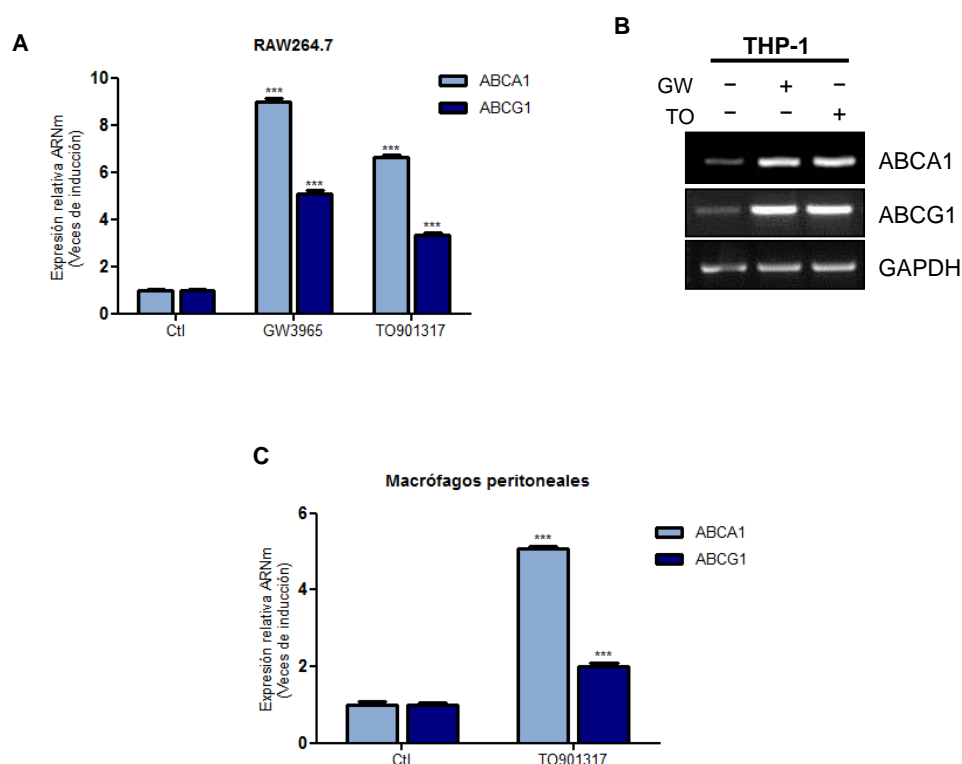
De esta forma comprobamos que existe permisividad en cuanto a la activación de LXRE por parte de los heterodímeros LXR/RXR, ya que tiene lugar tanto en presencia de ligandos de LXR como en presencia de ligandos de RXR. El tratamiento combinado con ligandos de LXR (TO901317, 25HC) y de RXR (9cisRA), produjo un efecto cooperativo y por tanto un mayor aumento de actividad luciferasa, tanto en ausencia como en presencia de receptores exógenos LXR $\alpha$  o RXR $\alpha$  co-transfectados.



**Figura 2: Inducción de actividad luciferasa dependiente de LXRE tras el tratamiento con ligandos de LXR y RXR**

Células RAW264.7 (**A**) o THP-1 (**B**) transfectadas transitoriamente con la construcción LXRE-luc se trataron con los ligandos de LXR (TO901317 y GW3965, 1  $\mu$ M) durante 18 horas. **C**, Células RAW264.7 co-transfectadas transitoriamente con LXRE-luc junto con plásmidos de expresión para LXR $\alpha$ , RXR $\alpha$  o vector vacío como control. Las células se incubaron con los ligandos de LXR (TO901317 a 1  $\mu$ M y 25HC a 10  $\mu$ M) y/o ligandos de RXR (9cisRA, 1  $\mu$ M) durante 18 horas. Los resultados de un experimento representativo llevado a cabo por triplicado se muestran como veces de inducción con respecto a las células no tratadas (RLUs por mg de proteína de la muestra / RLUs por mg de proteína del control)  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto al control (Ctl).

A continuación, y con el fin de comprobar la capacidad de trans-activación de los receptores LXR sobre genes endógenos en estas células, se analizó mediante *RT-PCR* la expresión de genes diana de LXR, como los transportadores de colesterol ABCA1 y ABCG1 (Töröcsik, D., *et al.*, 2009). Como se muestra en la figura 3, se observó un aumento en los niveles de ARNm de estos genes en respuesta al tratamiento con los ligandos sintéticos T0901317 y GW3965, tanto en células RAW264.7 (Figura 3A) como en células THP-1 (Figura 3B) o en macrófagos peritoneales de ratón (Figura 3C).



**Figura 3: Inducción de ABCA1 y ABCG1 por acción de los ligandos de LXR en macrófagos**

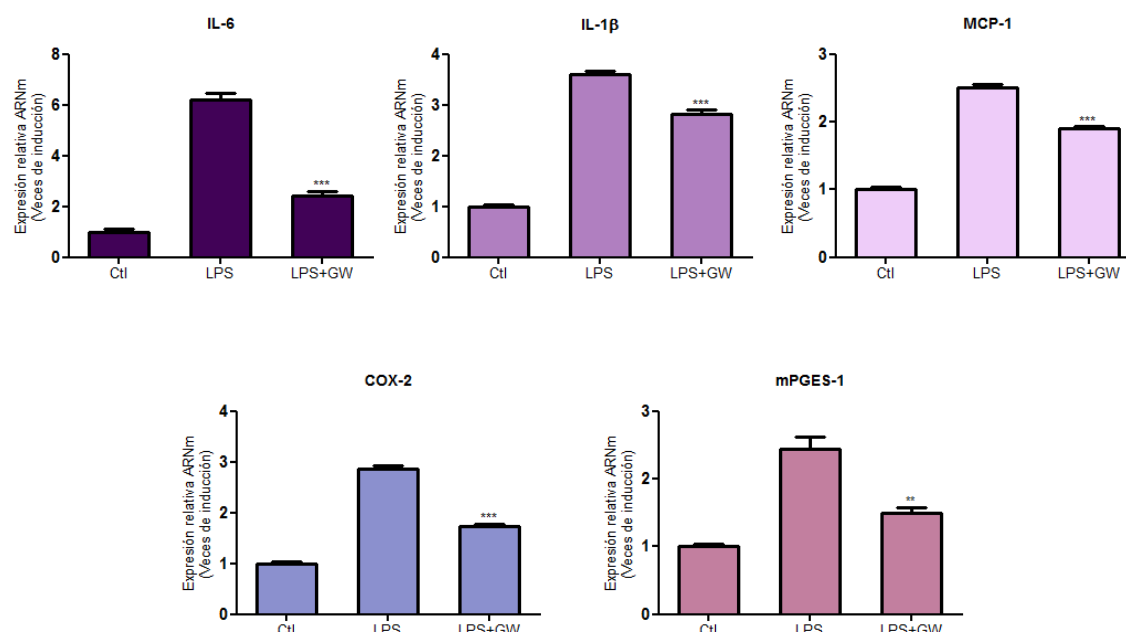
Las células se trataron durante 18 horas con los ligandos indicados - T0901317 (TO), GW3965 (GW) - a una concentración de 1  $\mu$ M en el caso de células RAW264.7 (**A**) y THP-1 (**B**), y a una concentración de 0,5  $\mu$ M en el caso de los macrófagos peritoneales de ratón (**C**). Los niveles de ARNm de los genes ABCA1 y ABCG1 se analizaron mediante *RT-PCR* cuantitativa en el caso de las células RAW264.7 y macrófagos peritoneales o amplificación por *RT-PCR* y análisis en gel de agarosa en el caso de las células THP-1. Los resultados de *RT-PCR* cuantitativa se normalizaron respecto a la expresión endógena del ARNr 18S. En el caso de las células THP-1 se muestran los niveles de GAPDH como control. Las gráficas muestran un experimento significativo, en el cual los datos obtenidos por triplicado están representados como veces de inducción con respecto a los valores obtenidos en las células sin tratar (expresión relativa de ARNm en la muestra / expresión relativa de ARNm en las células control)  $\pm$  SD. \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto al control (Ctl).

Estos resultados permiten concluir que, en los modelos celulares de macrófagos utilizados, existe una expresión endógena de receptores LXR capaces de mediar, en respuesta a ligandos LXR o en combinación con ligandos de receptores RXR, la trans-activación de la expresión de genes, como aquellos implicados en el transporte reverso de colesterol.

### **1.2. Represión de la expresión de COX-2 y mPGES-1 por efecto de los ligandos de LXR en macrófagos**

Dado que los efectos anti-inflamatorios de la activación de receptores LXR en macrófagos parecen estar mediados principalmente por la trans-represión de ciertos genes implicados en el proceso inflamatorio (Rigamonti, E., *et al.*, 2008), se analizó la capacidad de represión génica en respuesta a ligandos de LXR en macrófagos.

La activación de células RAW264.7 por LPS promueve la inducción transcripcional de la expresión de genes pro-inflamatorios entre los que destacan citoquinas como la IL-6 y la IL-1 $\beta$ , quimioquinas como MCP-1 o enzimas implicadas en la síntesis de prostanoïdes como la COX-2 o la mPGES-1. Tras el tratamiento de células RAW264.7 con LPS, se puede observar un incremento de la expresión de estos genes (Figura 4). En todos los casos, observamos a su vez, una disminución en la inducción por LPS de sus niveles de ARNm en presencia del ligando de LXR GW3965. El porcentaje de inhibición varió en función del gen estudiado, oscilando entre valores de 21 - 25 % de disminución en la expresión respecto a aquella inducida por el tratamiento con LPS en el caso de IL-1 $\beta$  y MCP-1, hasta valores de 40 % de inhibición en los casos de COX-2 y mPGES-1, o incluso 60% de reducción en el caso de la expresión de IL-6.

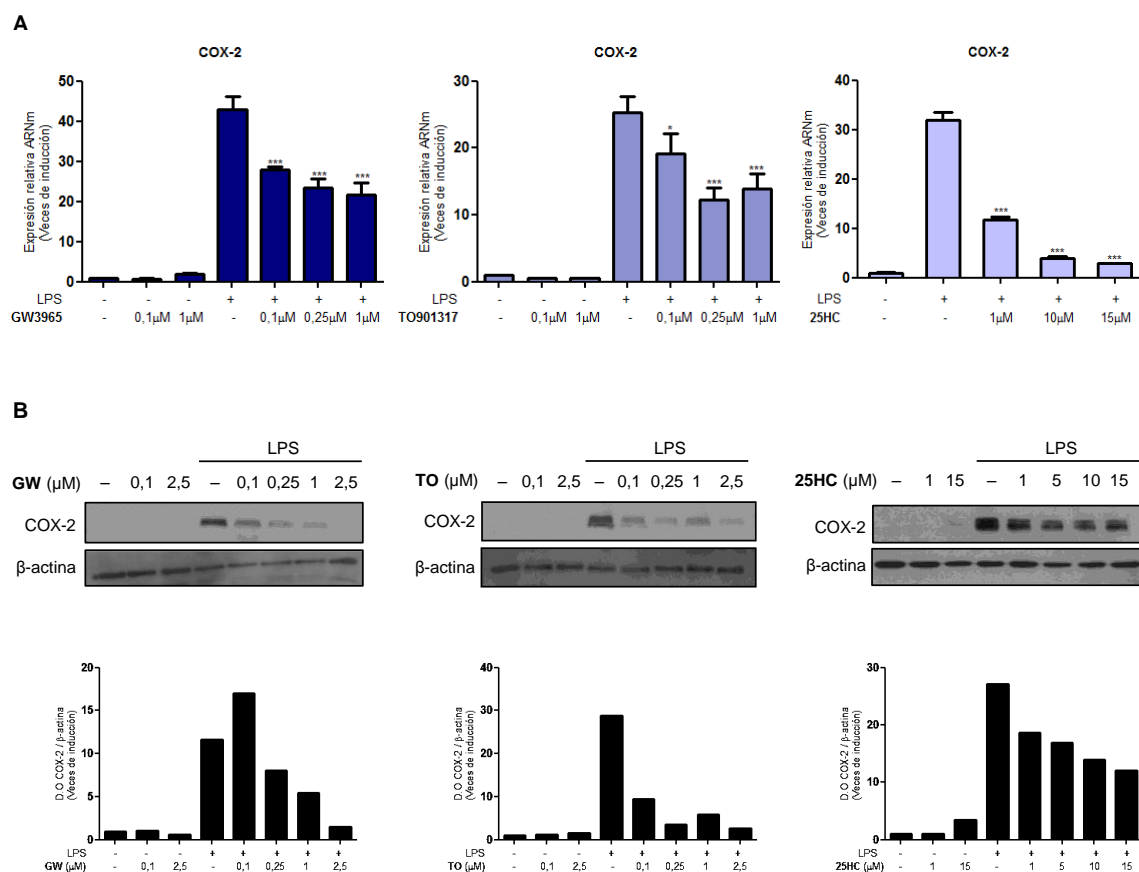


**Figura 4: Efectos de ligandos de LXR en la expresión de genes pro-inflamatorios en células RAW264.7**

Las células RAW264.7 se trataron con el ligando de LXR GW3965 (GW) a 1  $\mu$ M una hora antes de su estimulación con LPS (2  $\mu$ g/ml) durante 18 horas. Se analizó mediante *RT-PCR* cuantitativa la expresión de IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1, COX-2 y mPGES-1. Los resultados se normalizaron respecto a la expresión endógena del ARNr 18S. Las gráficas muestran un experimento significativo, en el cual los datos obtenidos por triplicado están representados como veces de inducción (expresión relativa de ARNm en la muestra / expresión relativa de ARNm en el control (Ctl))  $\pm$  SD. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto al LPS.

Con el fin de analizar en mayor detalle los efectos de la activación de receptores LXR sobre la expresión de la enzima COX-2, se trataron células RAW264.7 con diferentes dosis de los ligandos de LXR GW3965, TO901317 y 25HC antes de su estimulación con LPS (Figura 5). Se comprobó que el aumento de expresión de COX-2 inducido por LPS, se ve reducido mediante el tratamiento con dichos ligandos, de forma dependiente de la dosis. La reducción en la inducción de la expresión de COX-2 en esta línea celular fue evidente tanto a nivel de ARNm (Figura 5A) como a nivel de proteína (Figura 5B) y se observó tanto en el caso de los tratamientos con ligandos sintéticos de LXR, como en el caso de los tratamientos con el derivado del colesterol 25HC.

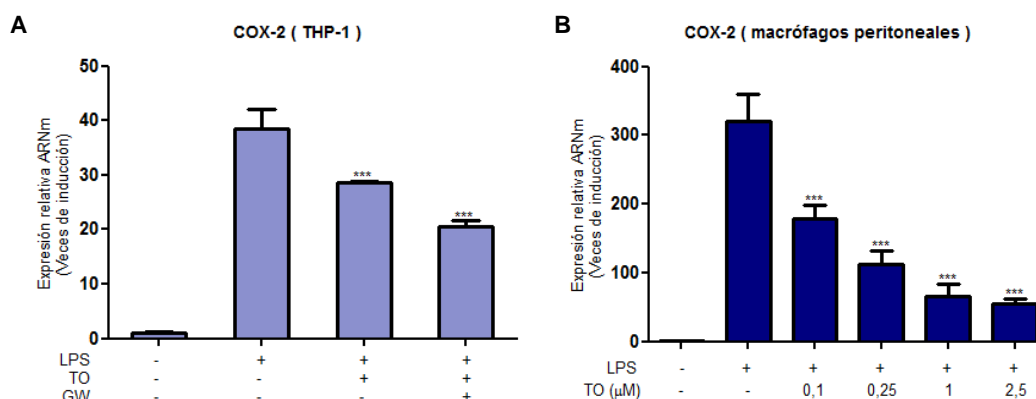




**Figura 5: Inhibición de la expresión inducida por LPS de COX-2 por efecto de ligandos de LXR en células RAW264.7**

Las células RAW264.7 se trataron con los ligandos de LXR GW3965, TO901317 y 25HC a las concentraciones indicadas una hora antes del tratamiento con LPS (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 18 horas. Los niveles de ARNm de COX-2 se determinaron mediante *RT-PCR* cuantitativa (**A**) y los niveles de proteína mediante *Western blot* (**B**). Las gráficas de *RT-PCR* cuantitativa muestran un experimento significativo, en el cual los datos obtenidos por triplicado y normalizados por los niveles de ARNr 18S, están representados como veces de inducción (expresión relativa de ARNm en la muestra / expresión relativa de ARNm en el control)  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto al LPS. Los resultados de expresión de proteína se muestran como un *Western blot* representativo y su análisis densitométrico normalizado por la expresión de  $\beta$ -actina en el panel inferior.

A continuación, y con el fin de confirmar que los resultados obtenidos ocurrieran en otros modelos celulares de macrófagos, analizamos la expresión de COX-2 en la línea celular humana THP-1 (Figura 6A) y en macrófagos primarios de peritoneo de ratón (Figura 6B). De forma similar a lo observado en células RAW264.7, se comprobó que la estimulación de los cultivos celulares con LPS induce la expresión de COX-2, y que dicha inducción se ve reducida en presencia de ligandos de LXR.

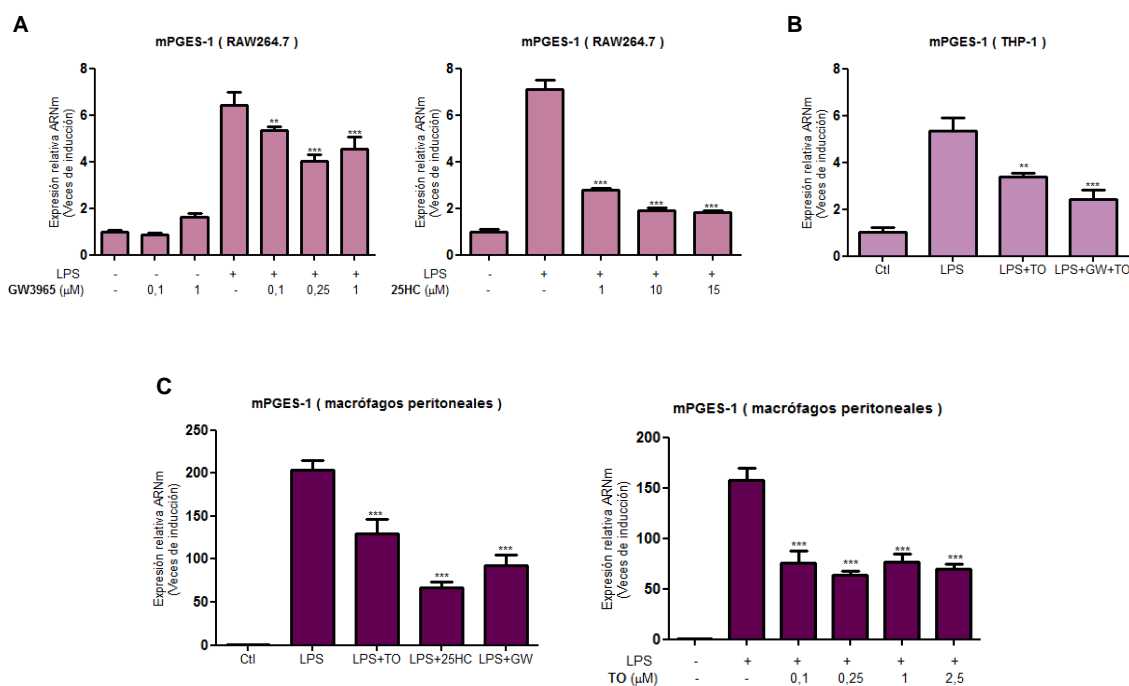


**Figura 6: Inhibición de la expresión inducida por LPS de COX-2 por efecto de ligandos de LXR en células THP-1 y en macrófagos peritoneales de ratón**

**A**, Las células THP-1 se trataron con los ligandos de LXR GW3965 (GW) y TO901317 (TO) a 1  $\mu$ M una hora antes de la estimulación con LPS (2  $\mu$ g/ml) durante 18 horas. **B**, Los macrófagos peritoneales de ratón se trataron con el ligando TO901317 (TO) a las concentraciones indicadas (0,1 a 2,5  $\mu$ M) previamente a la incubación con LPS (2  $\mu$ g/ml) durante 18 horas. En ambos casos se analizaron los niveles de ARNm de COX-2 mediante *RT-PCR* cuantitativa. Las gráficas muestran un experimento significativo, en el cual los datos obtenidos por triplicado y normalizados por la expresión del ARNr 18S, están representados como veces de inducción (expresión relativa de ARNm de la muestra / expresión relativa de ARNm en el control)  $\pm$  SD. \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto al LPS.

Además de la regulación de la expresión de la COX-2, otro factor determinante en el balance final de producción de prostaglandinas por parte de los macrófagos y en los procesos inflamatorios en general, es la regulación de la expresión de sintasas terminales de esta vía, como la mPGES-1 en el caso de la síntesis de PGE<sub>2</sub> (Samuelsson, B., *et al.*, 2007). Por este motivo, quisimos comprobar los efectos de la activación de receptores LXR sobre la expresión de esta prostaglandina sintasa (Figura 7).

Se detectó una reducción de la expresión inducida por LPS de mPGES-1 debida al tratamiento con agonistas de LXR, tanto ligandos sintéticos como ligandos naturales. La inhibición de la inducción de mPGES-1 mediada por activación de receptores LXR se observó tanto en las líneas celulares RAW264.7 (Figura 7A) y THP-1 (Figura 7B), como en macrófagos peritoneales de ratón (Figura 7C).



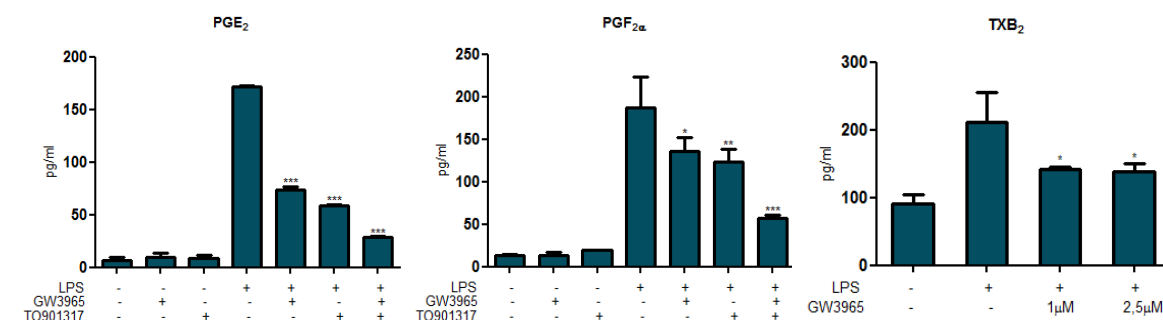
**Figura 7: Efecto de los ligandos de LXR sobre la expresión inducida por LPS de mPGES-1 en macrófagos**

Las células RAW264.7 (**A**), y THP-1 (**B**) se trataron con los ligandos de LXR GW3965 (GW), TO901317 (TO) y 25HC, a las concentraciones indicadas (en A) o bien a 2,5 μM (en B), una hora antes de incubarse con LPS (2 μg/ml) durante 18 horas. **C**, Los macrófagos peritoneales de ratón se trataron con diferentes ligandos de LXR a 0,5 μM o con TO901317 a diferentes dosis, previamente a la estimulación con LPS. En todos los casos se analizaron los niveles de ARNm de mPGES-1 mediante *RT-PCR* cuantitativa. Las gráficas muestran un experimento significativo, en el cual los datos obtenidos por triplicado y normalizados por los niveles de ARNr 18S, están representados como veces de inducción (expresión relativa de ARNm de la muestra / expresión relativa de ARNm en el control (Ctl)) ± SD. \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 con respecto a LPS.

A la vista de los resultados obtenidos, la activación de receptores LXR en macrófagos produce una disminución de su respuesta a la estimulación con LPS en cuanto a la expresión de COX-2 y mPGES-1. Por ello, nuestro siguiente paso consistió en analizar si la disminución en la expresión de estas enzimas por ligandos de LXR se traduce en un efecto sobre la producción de prostaglandinas en el medio de cultivo.

Comprobamos mediante ensayos ELISA que, mientras que en ausencia de ligandos de LXR el tratamiento de las células con LPS produce un aumento en la producción de prostanoides, en presencia de los ligandos TO901317 o GW3965 dicho incremento fue significativamente menor. En particular, se detectó una concentración menor de las prostaglandinas PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> y también de TXB<sub>2</sub>, en los sobrenadantes de cultivo de células RAW264.7 que fueron tratadas con ligandos de LXR antes de su

estimulación con LPS, respecto a aquellas estimuladas en ausencia de agonistas de LXR (Figura 8).



**Figura 8: Efecto de los ligandos de receptores LXR sobre la producción de prostanooides en células RAW264.7**

Las células RAW264.7 se trataron con GW3965 y TO901317 (2,5 μM) durante una hora antes de la estimulación con LPS (2 μg/ml) durante 18 horas. A continuación se recogió el sobrenadante de los cultivos y se analizó la concentración de PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y TXB<sub>2</sub> mediante ELISA. Los resultados de un experimento representativo se muestran en pg/ml como media ± SD. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 con respecto a LPS.

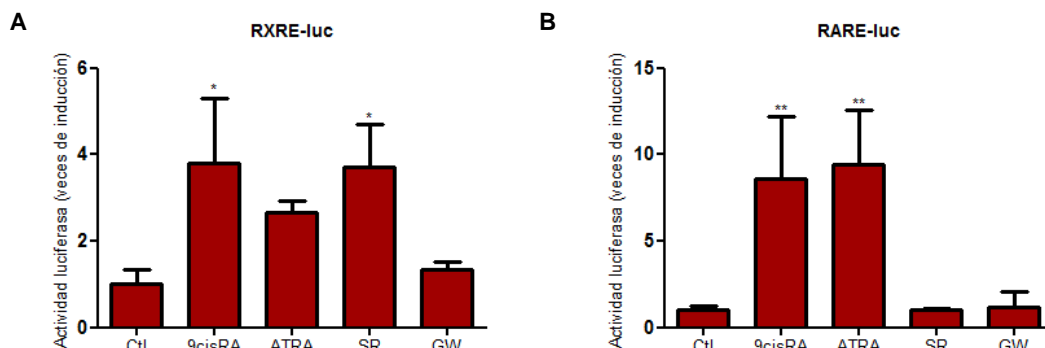
### 1.3. Represión de la expresión de COX-2 y mPGES-1 por activación de receptores LXR y RXR en macrófagos

A continuación, con el objetivo de analizar si, de forma análoga a lo observado en el caso de la trans-activación de genes a través de elementos de respuesta LXRE mediante la incubación con ligandos de LXR y RXR, existe cooperación de los heterodímeros LXR/RXR también en cuanto al efecto de trans-represión de la expresión génica, estudiamos los efectos de los ligandos de RXR sobre la transcripción de genes en macrófagos.

En primer lugar se estudió la capacidad de los diferentes ligandos para inducir la actividad luciferasa dependiente de elementos de respuesta a RXR (RXRE) y a otro receptor de la familia de receptores nucleares hormonales muy relacionado, como es el RAR (RARE). Como muestra la figura 9A, los ligandos de RXR 9cisRA y SR11237 fueron capaces de inducir la actividad luciferasa mediada por la construcción RXRE-luc. El tratamiento con ATRA también produjo, aunque en menor medida, una inducción de la actividad luciferasa a través de este elemento RXRE.

Por otro lado, la actividad luciferasa mediada por la construcción RARE-luc, se incrementó tras el tratamiento con ATRA y con 9cisRA, mientras que el ligando específico de RXR, SR11237 no tuvo un efecto significativo (Figura 9B). En ninguno de los casos el

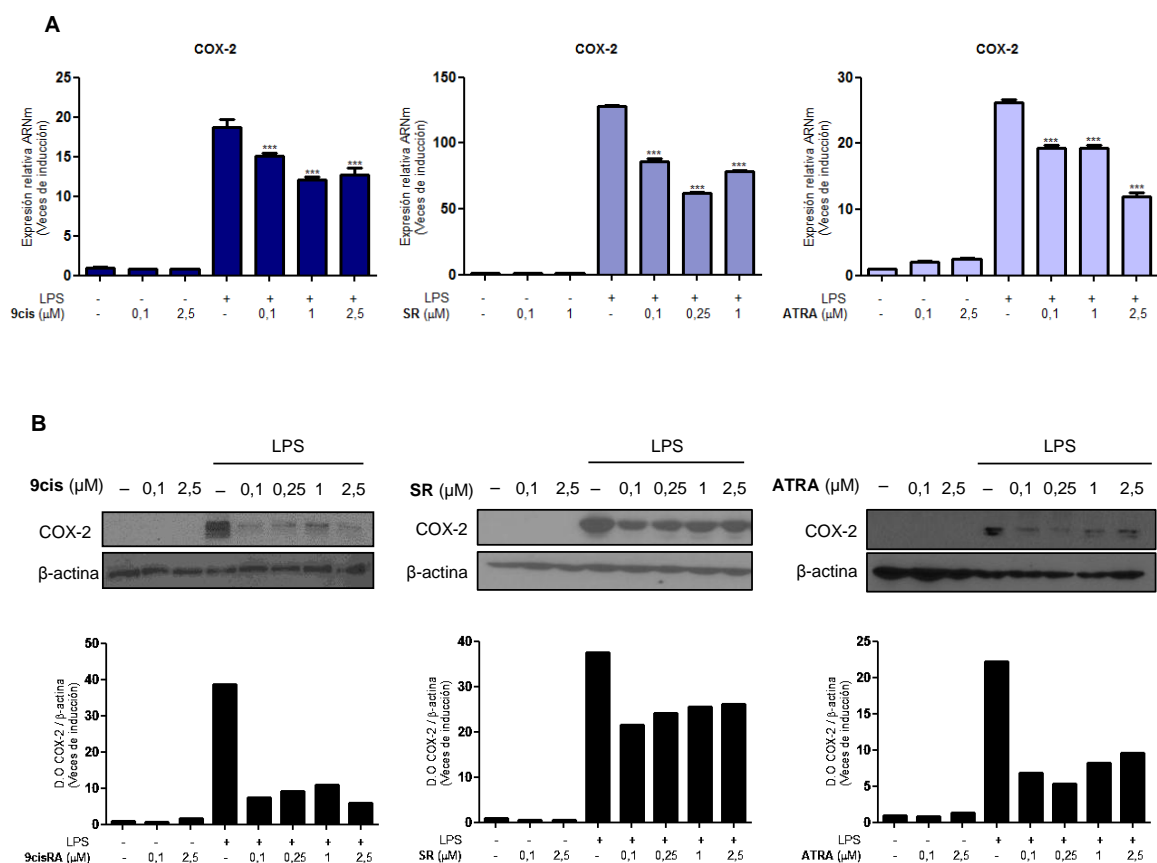
ligando de LXR GW3965 tuvo algún efecto significativo sobre la actividad luciferasa dependiente, bien de elementos RXRE, o de elementos RARE.



**Figura 9: Inducción de la actividad luciferasa dependiente de RXRE y RARE tras el tratamiento con ligandos de RXR y RAR en macrófagos**

Las células THP-1 se transfectaron transitoriamente con las construcciones RXRE-luc **(A)** o RARE-luc **(B)**. Las células transfectadas se trataron con los ligandos indicados: ácido 9-cis retinoico (9cisRA), ácido *all-trans* retinoico (ATRA), SR11237 (SR) y GW3965 (GW) a 2  $\mu$ M durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, se midió la actividad luciferasa y se normalizó por la cantidad de proteína de cada muestra. Los resultados de un experimento representativo llevado a cabo por triplicado se muestran como veces de inducción (RLUs por mg de proteína en la muestra / RLUs por mg de proteína en el control)  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  respecto al control (Ctl).

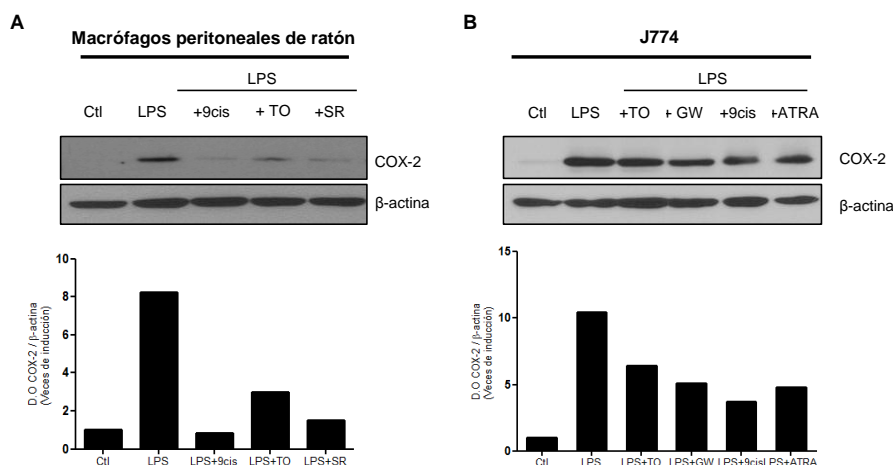
Una vez definida la capacidad de los diferentes ligandos para señalar a través de elementos de respuesta de los diferentes receptores nucleares estudiados, se analizaron los efectos de los ligandos 9cisRA, SR11237 y ATRA sobre la expresión de COX-2 en células RAW264.7. En todos los casos, los tres ligandos fueron capaces por sí mismos de reprimir la inducción de la expresión de esta ciclooxygenasa en respuesta a LPS, tanto a nivel de ARNm (Figura 10A) como de proteína (Figura 10B).



**Figura 10: Efecto de los ligandos de RXR y RAR sobre la expresión de COX-2 en células RAW264.7**

Las células RAW264.7 se trataron con los ligandos ácido 9-cis retinoico (9cisRA), SR11237 (SR) y ácido *all-trans* retinoico (ATRA) a las concentraciones indicadas (0,1 a 2,5 μM) una hora antes del tratamiento con LPS (2 μg/ml) durante 18 horas. Los niveles de ARNm de COX-2 se determinaron mediante *RT-PCR* cuantitativa (**A**) y los niveles de proteína mediante *Western blot* (**B**). Las gráficas de *RT-PCR* cuantitativa muestran un experimento significativo, en el cual los datos obtenidos por triplicado y normalizados por la expresión del gen 18S, están representados como veces de inducción (expresión relativa de ARNm en la muestra / expresión relativa de ARNm en el control) ± SD. \*\*\*  $p < 0,001$  respecto a LPS. Los resultados de expresión de proteína se muestran como un *Western blot* representativo y su análisis densitométrico normalizado por la expresión de β-actina en el panel inferior.

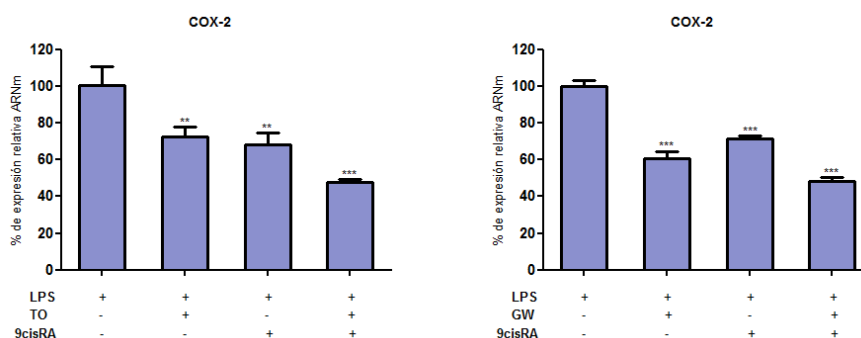
Como muestra la figura 11, y de forma similar a lo observado en células RAW264.7, en los macrófagos peritoneales de ratón (Figura 11A) y en la línea celular de macrófagos de ratón J774 (Figura 11B), los ligandos 9cisRA, SR11237 y ATRA tienen un efecto inhibitor sobre los niveles de expresión de la proteína COX-2 similar al observado con los ligandos de LXR TO901317 o GW3965.



**Figura 11: Efecto de los ligandos de LXR, RXR y RAR sobre la expresión de COX-2 inducida por LPS en macrófagos peritoneales de ratón y en células J774**

Análisis mediante *Western blot* de la expresión de COX-2 en macrófagos peritoneales (**A**) o células J774 (**B**) tratadas con los ligandos de RXR ácido 9-cis retinoico (9cis) y SR11237 (SR), de RAR, ácido *all-trans* retinoico (ATRA) y de LXR GW3965 (GW) y TO901317 (TO), todos ellos a 1  $\mu$ M, una hora antes de su estimulación con LPS (2  $\mu$ g/ml) durante 18 horas. Se muestra un *Western blot* representativo en cada caso y su análisis densitométrico normalizado por la expresión de  $\beta$ -actina en los paneles inferiores.

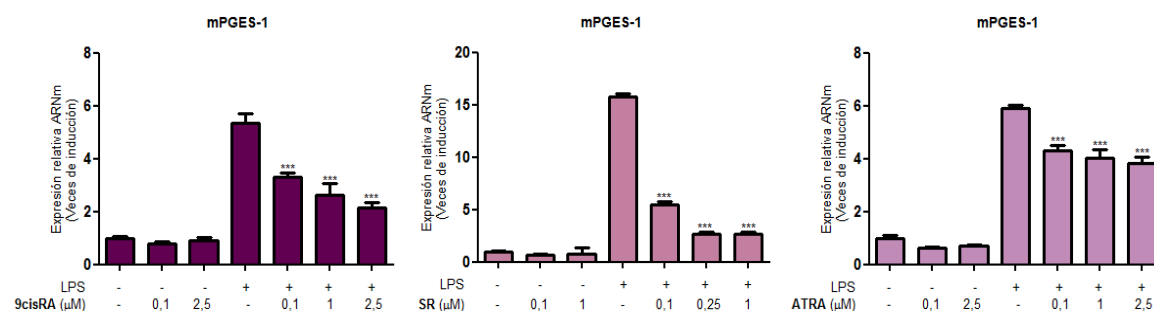
Por otra parte, la combinación de ligandos de LXR y de RXR, promueve un efecto cooperativo en cuanto a la represión de la inducción de COX-2 (Figura 12). La reducción en la expresión relativa de esta enzima es mayor cuando se tratan las células con ambos ligandos respecto a cada uno de ellos por separado, ya sea en el caso de 9cisRA+TO901317, o en el del tratamiento combinado con 9cisRA+ GW3965.



**Figura 12: Efecto cooperativo de los ligandos de LXR y RXR sobre la expresión de COX-2 inducida por LPS**

Las células RAW264.7 se trataron con el ligando de RXR ácido 9-cis retinoico (9cisRA), en combinación con los ligandos de LXR TO901317 (TO) o GW3965 (GW) durante una hora, todos ellos a 1  $\mu$ M. A continuación se estimuló el cultivo con LPS (2  $\mu$ g/ml) durante 18 horas más y se analizó la expresión de COX-2. Las gráficas muestran un experimento significativo, en el cual los datos obtenidos por triplicado están normalizados por la expresión endógena del ARNr 18S y representados como % de expresión relativa tomando como 100 % los niveles relativos de ARNm tras la estimulación con LPS  $\pm$  SD. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  respecto a LPS.

En cuanto a los efectos de los ligandos de RXR y RAR sobre la expresión de mPGES-1, tal y como observamos en el caso de COX-2, los tratamientos tanto con 9cisRA, SR11237, como con ATRA regulan de forma negativa y dependiente de la dosis, la inducción de la expresión de esta sintasa en respuesta a LPS (Figura 13).



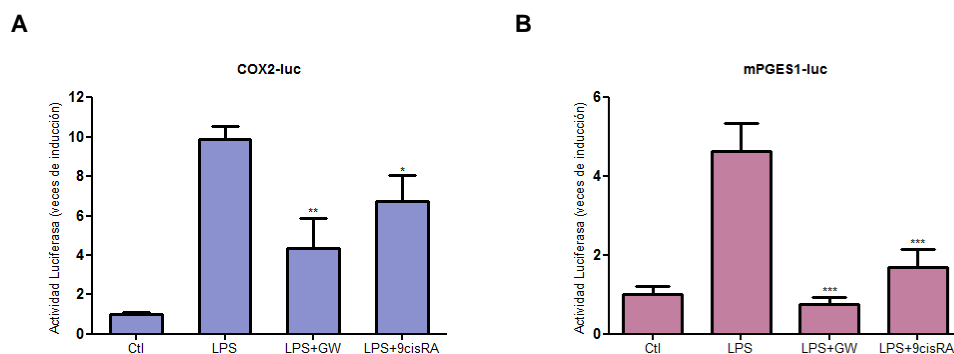
**Figura 13: Efecto de los ligandos de RXR y RAR sobre la expresión de mPGES-1**

Las células RAW264.7 se trataron con los ligandos de RXR ácido 9-cis retinoico (9cisRA) y SR11237 (SR) y de RAR ácido *all-trans* retinoico (ATRA), a las concentraciones indicadas. Tras una hora, se añadió LPS (2 µg/ml) al medio de cultivo durante 18 horas y se analizó la expresión de mPGES-1 mediante *RT-PCR* cuantitativa. Las gráficas muestran un experimento significativo, en el cual los datos obtenidos por triplicado y normalizados por la expresión del gen 18S, están representados como veces de inducción (expresión relativa de ARNm en la muestra / expresión relativa de ARNm en el control)  $\pm$  SD. \*\*\*  $p < 0,001$  respecto a LPS.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, nuestro siguiente paso consistió en estudiar si la regulación de la expresión génica de COX-2 y de mPGES-1 mediada por la activación de receptores LXR, tenía lugar a nivel transcripcional. Para ello, transfectamos transitoriamente células THP-1 con los promotores de los genes de estas dos enzimas.

En el caso de la construcción COX2-luc conteniendo la zona promotora del gen COX-2, observamos que el aumento de actividad luciferasa inducida mediante la activación con LPS se vió reducido por el tratamiento con el ligando GW3965, y también, aunque en menor medida, tras la incubación con 9cisRA (Figura 14A). De forma similar, en el caso del promotor de la mPGES-1 (mPGES1-luc), tanto el tratamiento con GW3965, como con 9cisRA, produjo una reducción sustancial de la actividad luciferasa dependiente de este promotor respecto a la actividad inducida por LPS (Figura 14B).





**Figura 14: Regulación transcripcional de COX-2 y mPGES-1 por activación de receptores LXR/RXR**

Células THP-1 transfectadas transitoriamente con la construcción COX2-luc **(A)** o mPGES1-luc **(B)** se trataron con los ligandos de LXR GW3965 (GW) y de RXR ácido 9-cis retinoico (9cisRA) a 2  $\mu$ M una hora antes de su estimulación con LPS (2  $\mu$ g/ml) durante 18 horas más. Los resultados de un experimento representativo muestran la actividad luciferasa como veces de inducción (RLUs por mg de proteína en la muestra / RLUs por mg de proteína en el control (Ctl))  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  respecto a LPS.

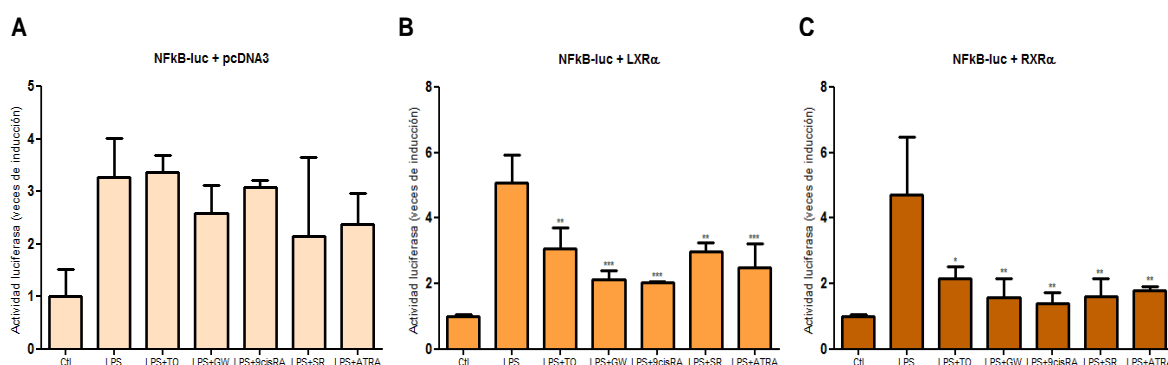
En conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el tratamiento con ligandos, bien de receptores LXR o de receptores RXR, ya sea solos o en combinación, promueven, en menor o mayor medida, una represión de la inducción transcripcional de genes pro-inflamatorios en macrófagos activados. En particular, el tratamiento con estos ligandos afecta de forma negativa a la expresión de COX-2 y mPGES-1, genes implicados en la producción exacerbada de prostanoïdes como la PGE<sub>2</sub>, en macrófagos activados.

#### 1.4. Factores de transcripción implicados en la represión génica mediada por receptores LXR en macrófagos

En la regulación de la expresión de COX-2 y mPGES-1 participan diversos factores de transcripción, dependiendo esencialmente del tipo celular y del estímulo en cuestión (Kang, Y.-J., *et al.*, 2007; Samuelsson, B., *et al.*, 2007). En particular, en macrófagos activados por LPS destaca la participación esencial de los factores NF $\kappa$ B y Egr-1 (Carmody, R.J. and Chen, Y.H., 2007; Kang, Y.-J., *et al.*, 2006; Khachigian, L.M., 2006). Con el fin de estudiar si la trans-represión mediada por receptores LXR que observamos en la expresión de estas dos enzimas, tiene lugar mediante interferencia con estos factores de transcripción, se analizó el efecto de los ligandos de LXR y RXR sobre la transcripción mediada por NF $\kappa$ B y Egr-1.

Estudios previos han puesto de manifiesto la interferencia sobre la regulación transcripcional mediada por NF $\kappa$ B debida a la activación de receptores LXR (Wu, S., *et*

*al.*, 2009). En nuestro caso, analizamos la implicación de NFκB en el mecanismo de trans-represión por LXR mediante co-transfección, en células THP-1, de la construcción NFκB-luc junto con plásmidos de expresión para los receptores LXRα, RXRα o un vector de expresión vacío. Como se muestra en la figura 15, la actividad luciferasa mediada por el factor de transcripción NFκB, se induce mediante la estimulación con LPS. Dicha inducción se ve reducida en presencia de ligandos de LXR, RXR y RAR cuando se sobreexpresa bien el receptor LXRα o el RXRα, confirmando el efecto inhibitor de estos ligandos sobre la activación de genes dependientes de NFκB.



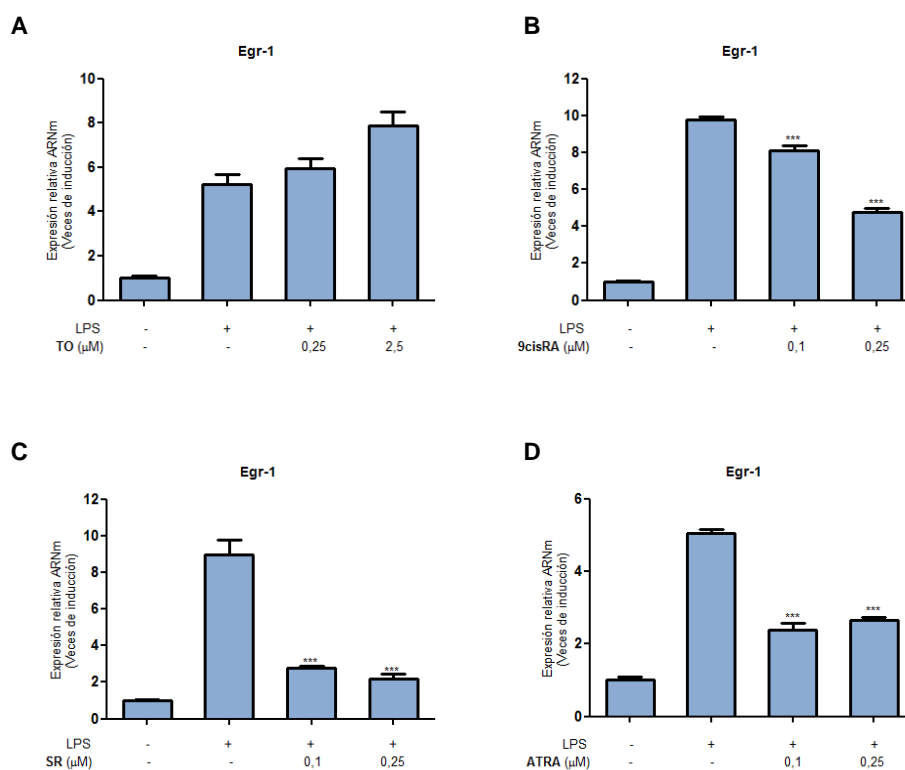
**Figura 15: Interferencia con la actividad del factor de transcripción NFκB mediada por activación de receptores LXR y RXR en macrófagos**

Las células THP-1 se transfectaron transitoriamente con la construcción NFκB-luc junto con vectores de expresión para LXRα (**B**), RXRα (**C**), o un vector vacío como control (**A**). Las células se trataron con los ligandos indicados (1 μM); ácido 9-cis retinoico (9cisRA), SR11237 (SR), ácido *all-trans* retinoico (ATRA), TO901317 (TO) y GW3965 (GW). Tras una hora de incubación, las células se estimularon con LPS (2 μg/ml) durante 18 horas. Los resultados de un experimento representativo muestran la actividad luciferasa como veces de inducción (RLUs por mg de proteína en la muestra / RLUs por mg de proteína en el control (Ctl)) ± SD. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 respecto a LPS.

Dado que, además de NFκB, el factor Egr-1 juega un papel importante en la inducción tanto de COX-2 como de mPGES-1, y que la implicación de Egr-1 en la trans-represión génica mediada por LXR se desconoce, analizamos la posible implicación de este último factor de transcripción en las acciones represoras de ligandos de LXR y RXR.

Para ello, en primer lugar, analizamos el efecto del tratamiento con estos ligandos sobre la expresión de Egr-1 en macrófagos. Mediante *RT-PCR* cuantitativa, observamos que la estimulación de células RAW264.7 durante 18 horas con LPS produce un aumento en los niveles de Egr-1. Esta inducción es reprimida en presencia de dosis crecientes de ligandos del receptor RXR como el 9cisRA y el SR11237, así como por el ATRA. En contraposición, este efecto inhibitorio no se observa en el caso del ligando TO901317 (Figura 16). Sin embargo, a nivel de expresión de proteína, la inducción de Egr-1 se ve

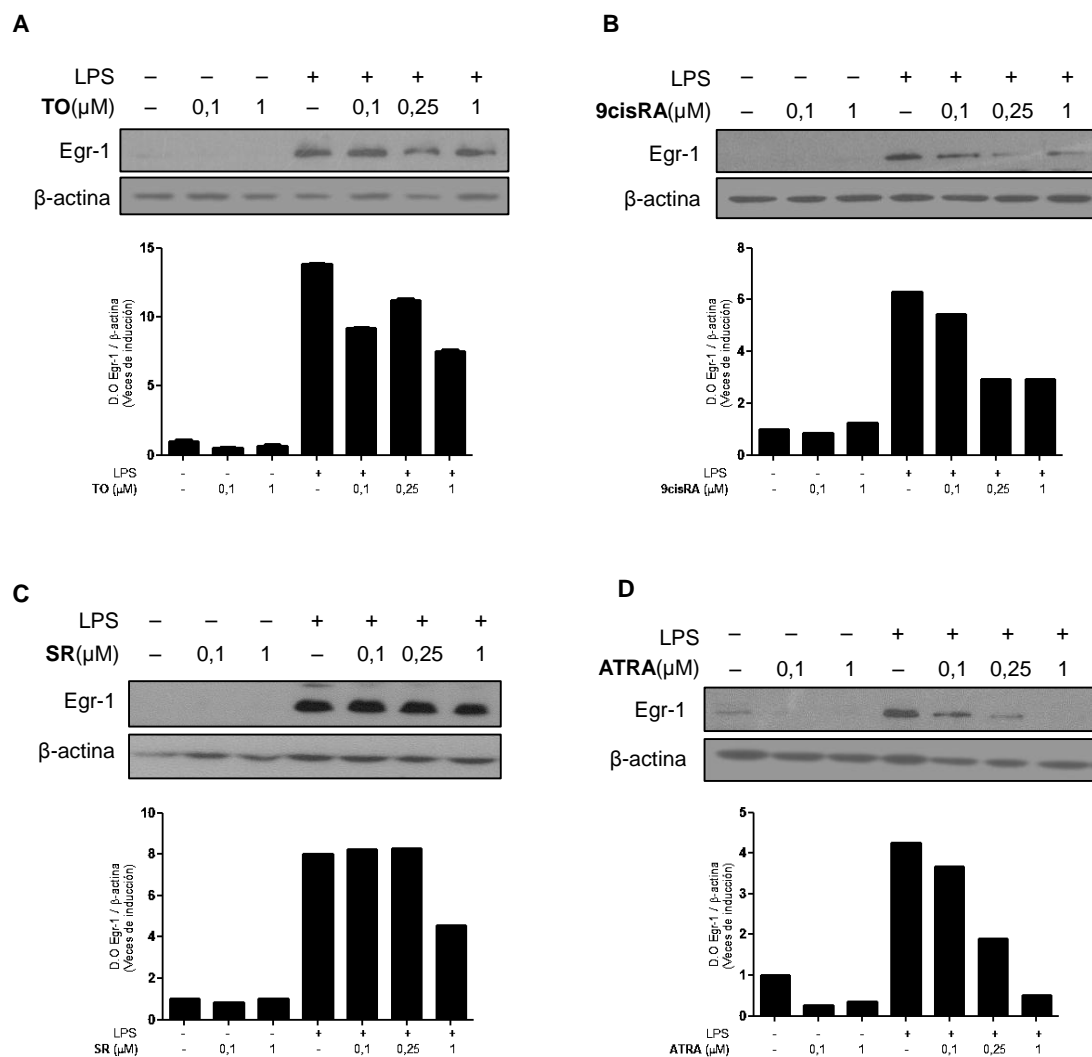
reducida significativamente tras la incubación con dosis crecientes de los ligandos de RXR y RAR así como, aunque en menor medida, con el ligando de LXR TO901317 (Figura 17).



**Figura 16: Interferencia con el factor de transcripción Egr-1 mediada por activación de receptores LXR y RXR en macrófagos**

Las células RAW264.7 se trataron con el ligando de LXR TO901317 (TO) **(A)**, ligandos de RXR ácido 9 *cis*-retinoico (9cisRA) **(B)** y SR11237 (SR) **(C)** o ácido *all-trans* retinoico (ATRA) **(D)** a las concentraciones indicadas una hora antes de su estimulación con LPS (2 μg/ml) durante 18 horas más. La expresión de Egr-1 se determinó mediante *RT-PCR* cuantitativa. Los resultados muestran un experimento significativo, en el cual los datos obtenidos por triplicado y normalizados por la expresión del gen 18S, están representados como veces de inducción (expresión relativa ARNm en la muestra / expresión relativa ARNm en el control) ± SD. \*\*\*  $p < 0,001$  respecto a LPS.

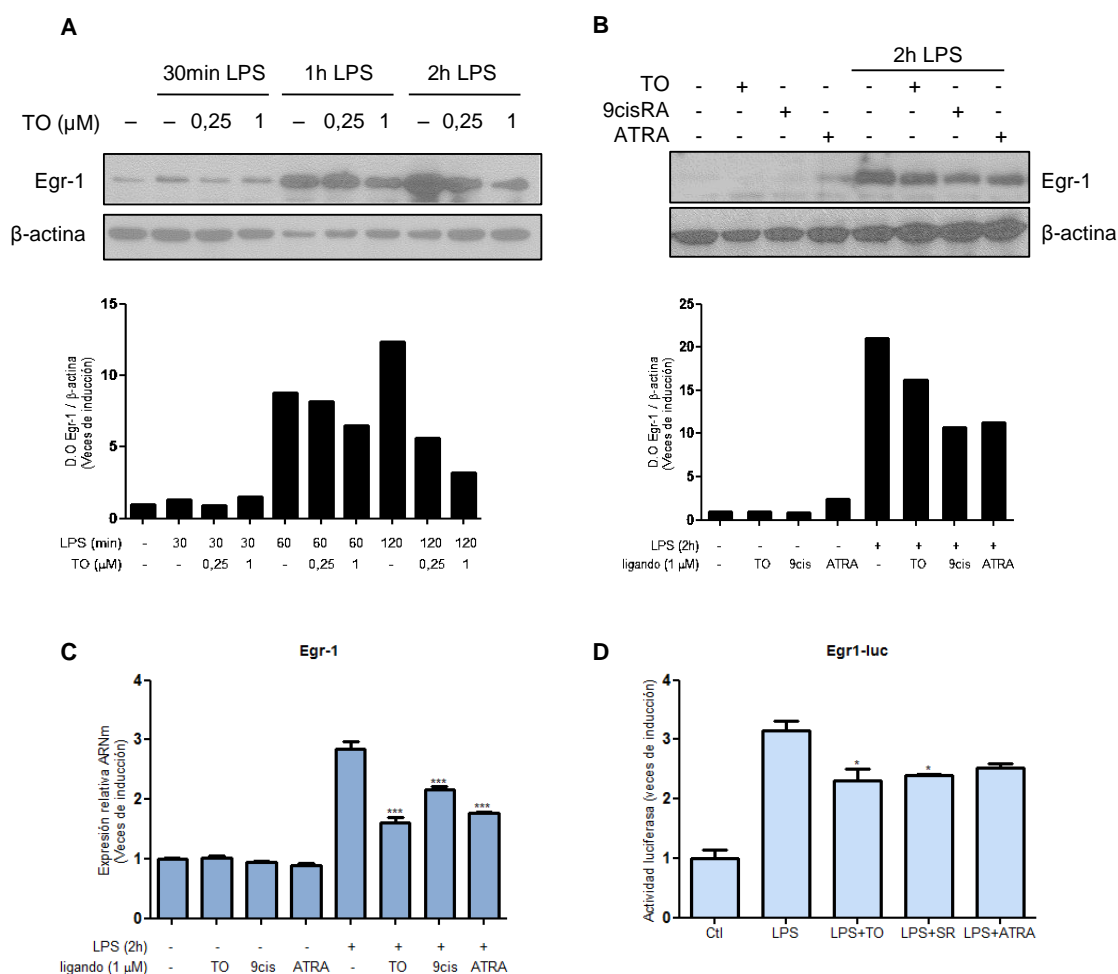
Por otra parte, la estimulación con LPS durante tiempos tan cortos como 2 horas es suficiente para inducir de forma eficiente la expresión de Egr-1. En estas condiciones se observa de nuevo que los ligandos de receptores LXR y RXR reducen la respuesta a LPS en cuanto a la expresión de este factor de transcripción a nivel proteína (Figura 18A y 18B). Además, a diferencia de lo observado en el caso de las estimulaciones largas durante más de 12 horas, en este contexto de incubaciones más cortas con LPS se observa un efecto trans-represor sobre Egr-1 que es significativo tanto en el caso de los tratamientos con TO901317 como con 9cisRA y ATRA y también a nivel de la expresión de su ARNm (Figura 18C).



**Figura 17: Disminución de la expresión inducida por LPS del factor de transcripción Egr-1 por efecto de ligandos de LXR y RXR en macrófagos**

Análisis de la expresión de Egr-1 en células RAW264.7 tratadas con TO901317 (TO) **(A)**, ácido 9-cis retinoico (9cisRA) **(B)**, SR11237 (SR) **(C)** o ácido *all-trans* retinoico (ATRA) **(D)** a las concentraciones indicadas durante una hora antes de su estimulación con LPS (2  $\mu$ g/ml) durante 18 horas más. Se muestra un *Western blot* representativo y su análisis densitométrico en veces de inducción respecto al control tras normalizar la expresión de Egr-1 por la de  $\beta$ -actina.

Teniendo en cuenta estos resultados, quisimos averiguar si la interferencia sobre la expresión de Egr-1 mediada por receptores LXR/RXR se traduce en una alteración de la expresión de genes cuya regulación está bajo el control de este factor de transcripción. Con este fin, transfectamos transitoriamente células THP-1 con la construcción Egr1-luc en la que la actividad luciferasa está bajo el control de sitios de unión de Egr-1 en el promotor del gen de la prolactina (Figura 18D). El tratamiento con LPS en las células transfectadas produce un aumento de la actividad luciferasa, que se ve reducido significativamente en presencia de ligandos de LXR y RXR en el medio de cultivo.



**Figura 18: Interferencia con la activación temprana del factor de transcripción Egr-1 mediada por receptores LXR y RXR en macrófagos**

Las células RAW264.7 se trataron con los ligandos indicados TO901317 (TO), ácido 9 cis-retinoico (9cisRA), SR11237 (SR) o ácido *all-trans* retinoico (ATRA) durante 1 hora, previa a la estimulación con LPS (2  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos, 1 ó 2 horas. **A y B**, Análisis de los niveles de proteína Egr-1 mediante *Western blot*. Se muestra un *Western blot* representativo y su análisis densitométrico en veces de inducción respecto al control, tras normalizar por los niveles de  $\beta$ -actina (paneles inferiores). **C**, Análisis por *RT-PCR* cuantitativa de los niveles de ARNm de Egr-1. Se muestra un experimento significativo, en el cual los datos obtenidos por triplicado y normalizados por la expresión del gen 18S, y están representados como veces de inducción (expresión relativa de ARNm en la muestra / expresión relativa de ARNm en el control)  $\pm$  SD. **D**, Células THP-1 transfectadas transitoriamente con la construcción Egr1-luc y tratadas con los ligandos indicados (1  $\mu$ M) durante una hora antes de su estimulación con LPS. Los resultados de un experimento representativo muestran la actividad luciferasa como veces de inducción (RLUs por mg de proteína en la muestra / RLUs por mg de proteína en el control (Ctl))  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  respecto a LPS.

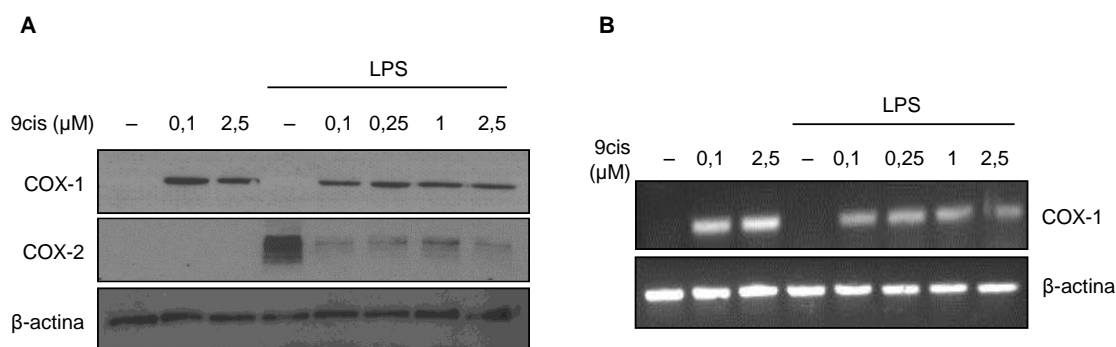
En resumen, los datos obtenidos en cuanto a la interferencia de ligandos de receptores LXR y RXR sobre la activación de factores de transcripción implicados en la inducción de la expresión génica en macrófagos activados, como NFκB o Egr-1, ponen de manifiesto un efecto negativo de dichos ligandos sobre ambos factores de transcripción, que pudiera explicar, mediante un mecanismo de trans-represión, los efectos negativos sobre la inducción transcripcional de genes inflamatorios como la COX-2 y la mPGES-1, entre otros.

## **2.- Efectos de los ligandos de receptores RXR y RAR sobre la expresión de COX-1 en macrófagos**

Los resultados obtenidos al respecto de las acciones de los ligandos de LXR y RXR sobre la expresión de genes implicados en la inducción de la síntesis de prostanoïdes tras la activación de macrófagos, como COX-2 o mPGES-1, ponen de manifiesto un efecto inhibitor de dichos ligandos sobre la inducción de la expresión de estos genes. Además de la isoforma inducible COX-2, existe otra isoforma de ciclooxigenasa, de expresión esencialmente constitutiva en la mayoría de los tejidos, como es la COX-1. Mientras que la expresión de COX-2 se ha asociado a procesos inflamatorios, la expresión de COX-1 se asocia principalmente a funciones homeostáticas (Warner, T.D. and Mitchell, J.A., 2004). En este apartado de la tesis doctoral se muestra el efecto de ligandos de los receptores LXR y RXR sobre la expresión de COX-1 en macrófagos.

### **2.1. Inducción de la expresión de COX-1 mediada por activación de receptores RXR en macrófagos**

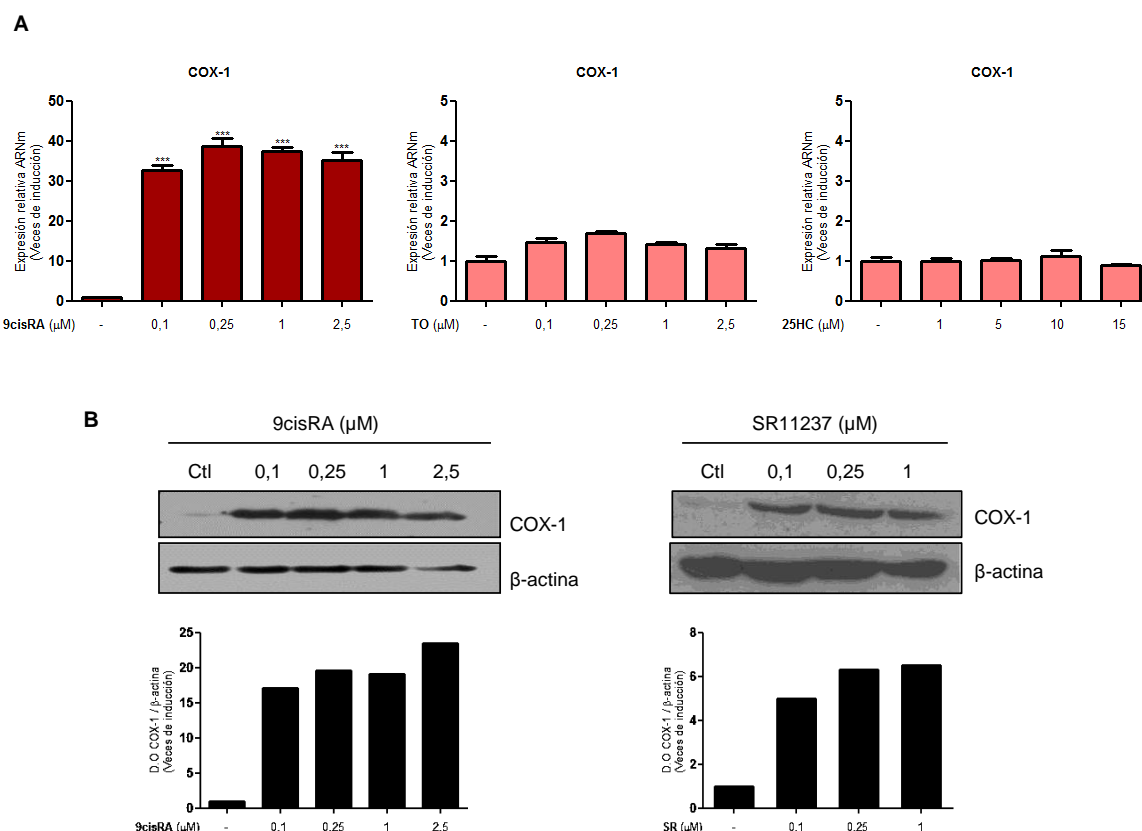
Como se muestra en la figura 19, las células RAW264.7, presentan bajos niveles de COX-1 que, a diferencia de COX-2, no se inducen tras el tratamiento con LPS. El tratamiento con dosis crecientes de 9cisRA reprime la expresión inducida por LPS de COX-2 mientras que, por el contrario, promueve una inducción de la expresión de COX-1, tanto en ausencia como en presencia de LPS.



**Figura 19: Efecto del tratamiento con 9cisRA sobre la expresión de COX-1 en células RAW264.7**

Las células RAW264.7 se trataron con ácido 9-cis retinoico (9cisRA) a las concentraciones indicadas durante 18 horas en presencia o ausencia de LPS (2 μg/ml). **A**, Análisis mediante *Western blot* de los niveles de COX-1, COX-2 y de β-actina como control. **B**, Análisis mediante *RT-PCR* de los niveles de ARNm de COX-1 y de β-actina como control.

El estudio detallado del efecto de ligandos tanto de LXR (TO901317 y 25HC), como de RXR (9cisRA) a diferentes dosis durante 18 horas muestra un aumento de los niveles de ARNm de COX-1 debido únicamente al tratamiento con ligandos de receptores RXR como 9cisRA desde concentraciones de 0,1 μM. Ninguno de los ligandos de LXR ensayados, como TO901317 o 25HC mostró un efecto significativo sobre la expresión de esta enzima a las dosis ensayadas (Figura 20A). El efecto inductor sobre la expresión de COX-1 también se pudo comprobar a nivel de proteína mediante *Western blot*. Dos ligandos diferentes de RXR como son el 9cisRA y el SR11237 promovieron un incremento significativo en la expresión de esta ciclooxigenasa desde dosis de 0,1 μM (Figura 20B).

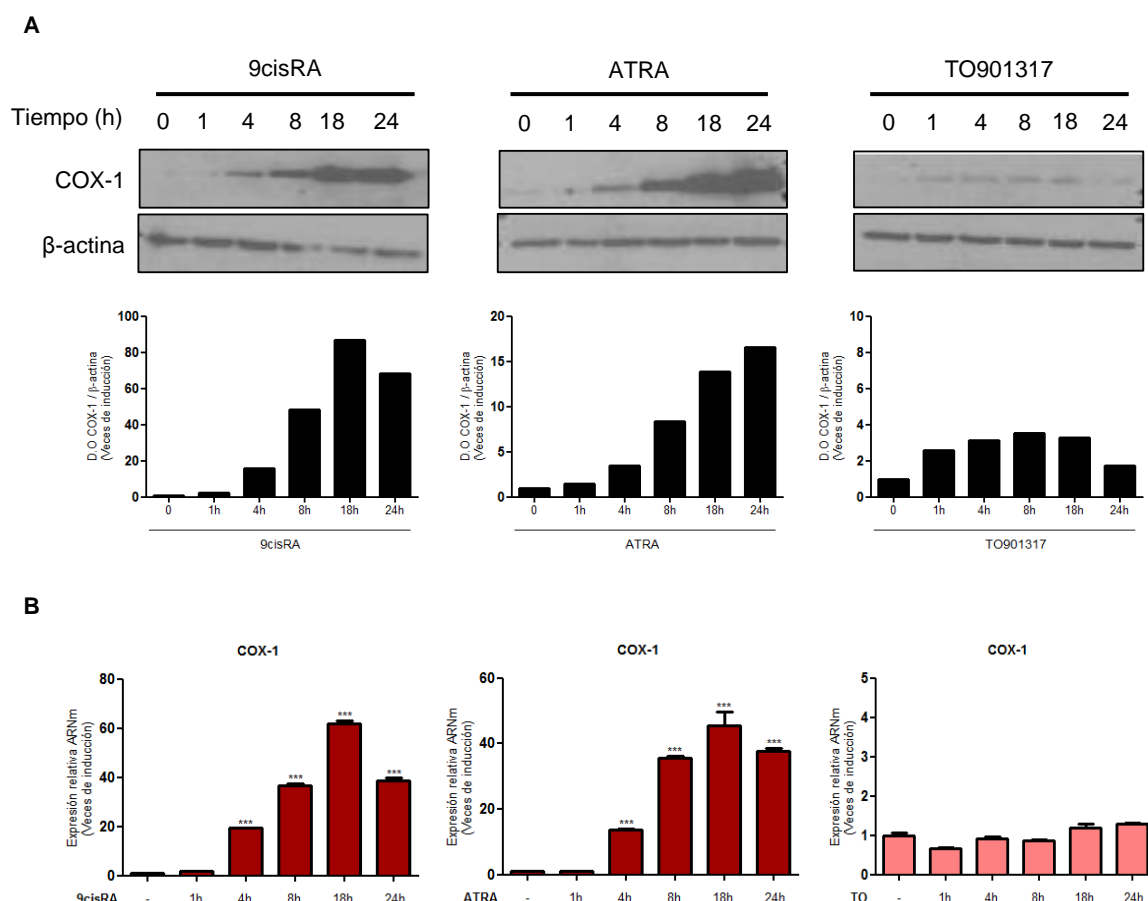


**Figura 20: Inducción de la expresión basal de COX-1 tras la activación con ligandos de RXR en células RAW264.7**

Las células se trataron con los ligandos de RXR ácido 9-cis retinoico (9cisRA) y SR11237 (SR) o con ligandos de LXR TO901317 (TO) y 25HC a las concentraciones indicadas durante 18 horas. **A**, Análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión de COX-1 tras los diferentes tratamientos. Los resultados muestran un experimento significativo, en el cual los datos obtenidos por triplicado y normalizados por la expresión del gen 18S, están representados como veces de inducción (expresión relativa ARNm en la muestra / expresión relativa ARNm en el control)  $\pm$  SD. \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto al control. **B**, Western blots que muestran los niveles de COX-1 y de  $\beta$ -actina como control, tras el tratamiento con ligandos de RXR. Las gráficas inferiores muestran el análisis densitométrico en veces de inducción respecto al control (Ctl) tras la normalización de la expresión de COX-1 por la de  $\beta$ -actina.

La inducción de COX-1 tanto por ligandos de RXR (9cisRA) como de RAR (ATRA) ocurre de forma temprana, detectándose un incremento progresivo de los niveles de proteína a lo largo del tiempo, ya desde las 4 horas (Figura 21). A ninguno de los tiempos ensayados se detectó incremento de la expresión de COX-1 tras el tratamiento con el ligando de LXR TO901317.



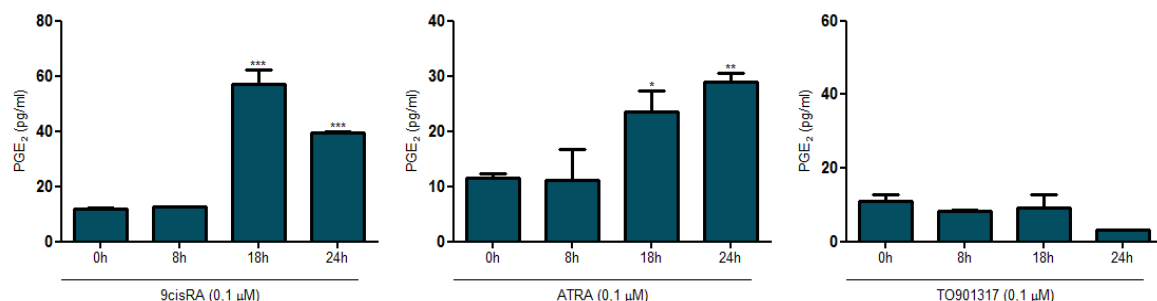


**Figura 21: Inducción a lo largo del tiempo de la expresión de COX-1 por efecto del tratamiento con ligandos de RXR y LXR en células RAW264.7**

Las células se trataron con 0,1  $\mu\text{M}$  de ácido 9-cis retinoico (9cisRA), ácido *all-trans* retinoico (ATRA) o TO901317 (TO) durante los tiempos indicados. Los niveles de proteína de COX-1 se determinaron mediante *Western blot* (**A**) y los niveles de ARNm mediante *RT-PCR* cuantitativa (**B**). Los resultados de expresión de proteína se muestran como un *Western blot* representativo y el análisis densitométrico en veces de inducción respecto al control tras la normalización de la expresión de COX-1 por la de  $\beta$ -actina. Las gráficas de *RT-PCR* cuantitativa muestran un experimento significativo, en el cual los datos obtenidos por triplicado y normalizados por los niveles de ARNr 18S, están representados como veces de inducción (expresión relativa de ARNm en la muestra / expresión relativa de ARNm en el control)  $\pm$  SD. \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto al control.

Teniendo en cuenta estos resultados pasamos a analizar como se refleja el aumento de expresión de COX-1 en cuanto a la producción de prostaglandinas. Para ello, analizamos mediante ensayos de ELISA la concentración de  $\text{PGE}_2$  en los sobrenadantes de cultivo de células RAW264.7 tratadas con 9cisRA, ATRA o TO901317. Se detectó un aumento en la concentración de esta prostaglandina en los cultivos celulares tratados con 9cisRA y ATRA durante 18-24 horas. Por el contrario, y de acuerdo con lo observado a nivel de expresión de proteína de COX-1, el tratamiento con TO901317 no tuvo efectos

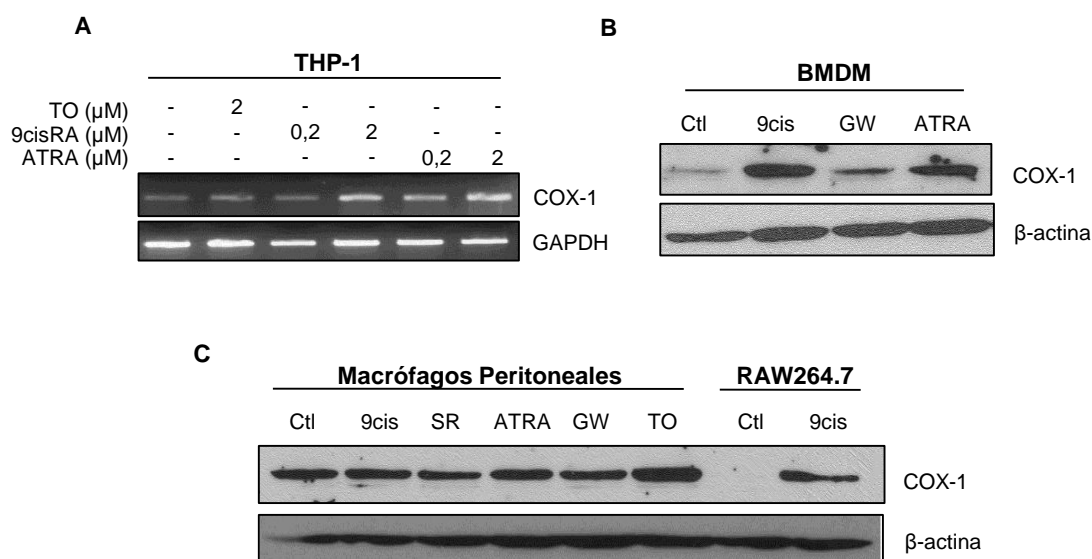
significativos sobre la producción de esta prostaglandina por células RAW264.7 (Figura 22).



**Figura 22: Efecto de los ligandos de receptores nucleares RXR, RAR y LXR sobre la producción de PGE<sub>2</sub> en el medio de cultivo de células RAW264.7**

Las células RAW264.7 se trataron con 0,1 µM de ácido 9-cis retinoico (9cisRA), ácido *all-trans* retinoico (ATRA) o TO901317 durante los tiempos indicados. A continuación se recogió el sobrenadante de los cultivos y se analizó la concentración de PGE<sub>2</sub> mediante ELISA. Se muestran los resultados de un experimento representativo como concentración media (pg/ml) ± SD. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 con respecto al control.

Con el objetivo de comprobar si la inducción de COX-1 por ligandos de RXR y RAR observada en las células RAW264.7 se producía en otras líneas de tipo monocito-macrófago, analizamos los efectos de ligandos de LXR, RXR y RAR en la línea celular THP-1 y en macrófagos primarios, ya fueran macrófagos peritoneales o macrófagos derivados de médula ósea de ratón. De forma similar a lo observado en células RAW264.7, se detectó un aumento de expresión de COX-1 mediado por 9cisRA y ATRA tanto en células THP-1 como en macrófagos derivados de médula ósea de ratón. En contraposición, los macrófagos peritoneales de ratón presentan altos niveles de COX-1 en condición basal, sin que se observe un efecto inductor de los ligandos de RXR-RAR sobre la expresión de dicha enzima (Figura 23).

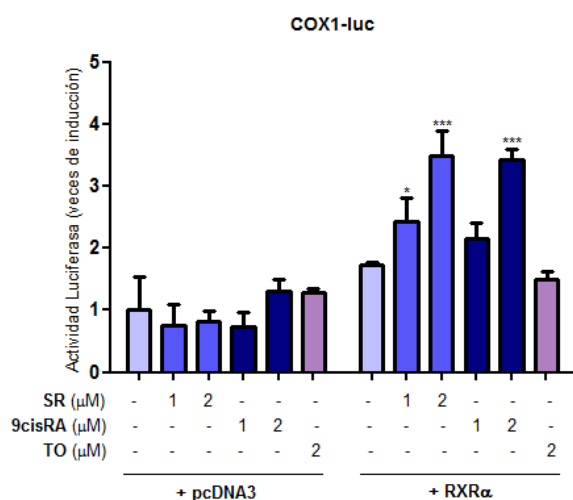


**Figura 23: Efecto de los ligandos de receptores RXR, RAR y LXR sobre la expresión de COX-1 en macrófagos**

**A**, Análisis mediante *RT-PCR* de los niveles de ARNm de COX-1 y GAPDH como control en células THP-1 tratadas con ácido 9-*cis* retinoico (9cisRA), ácido *all-trans* retinoico (ATRA) o TO901317 (TO) a las concentraciones indicadas durante 18 horas. **B**, Macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM) tratados con 9cisRA, ATRA o GW3965 (GW) a una concentración de 1 μM durante 18 horas. *Western blot* en el que se muestra la expresión de COX-1 y de β-actina como control. **C**, Análisis mediante *Western blot* de la expresión de COX-1 y de β-actina en macrófagos peritoneales de ratón tras el tratamiento con los diferentes ligandos 9cisRA, ATRA, GW, TO y SR11237 (SR) a 1 μM durante 18 horas. Los dos últimos carriles muestran el efecto del 9cisRA sobre COX-1 en células RAW264.7 como control.

## 2.2. Caracterización del mecanismo de acción de 9cisRA sobre la expresión de COX-1 en macrófagos

Con el fin de examinar si la inducción de COX-1 observada tras el tratamiento de células RAW264.7 con ligandos de RXR se produce a nivel transcripcional, se co-transfectaron transitoriamente las células con una construcción en la que la actividad luciferasa es dependiente del promotor de COX-1, junto con un vector de expresión del receptor RXRα o un vector vacío como control. Observamos que, mientras que en ausencia de receptor exógeno no hubo un efecto significativo de los ligandos sobre la actividad de la construcción COX1-luc, cuando se co-transfectó un vector de expresión de RXRα, el tratamiento con ligandos de RXR como 9cisRA y SR11237 produjo un aumento de la actividad luciferasa dependiente del promotor de COX-1 (Figura 24). La inducción a nivel transcripcional de COX-1 no se observó en ningún caso tras la activación de receptores LXR mediante el tratamiento de las células con TO901317.



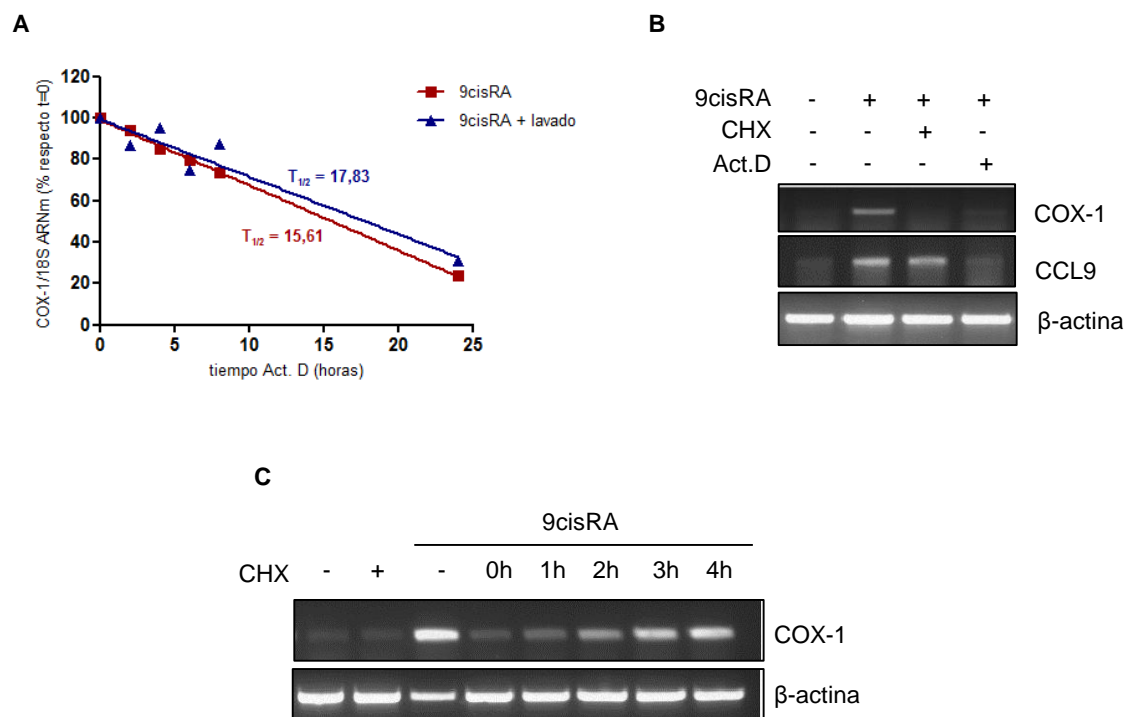
**Figura 24: Regulación transcripcional de COX-1 por ligandos de RXR en células RAW264.7**

Las células RAW264.7 se co-transfectaron transitoriamente con la construcción COX1-luc y un vector de expresión para RXRα o un vector vacío control. Las células se trataron con los ligandos indicados ácido 9-cis retinoico (9cisRA), SR11237 (SR) o TO901317 (TO) durante 18 horas. Los resultados de un experimento representativo muestran la actividad luciferasa como veces de inducción (RLUs por mg de proteína en la muestra / RLUs por mg de proteína en el control) ± SD. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto al control.

Nuestro siguiente objetivo fue determinar si la inducción de COX-1 por 9cisRA se veía asociada a efectos sobre la estabilidad de su ARNm. Para ello, analizamos el tiempo de vida medio del ARNm de COX-1 en células RAW264.7 en presencia y en ausencia de 9cisRA en el medio de cultivo tras el bloqueo de la transcripción con actinomicina D. No se detectaron diferencias significativas en el tiempo de vida medio calculado del orden de 15-17 horas, indicando que la inducción de COX-1 por ligandos de RXR no conlleva cambios en la estabilidad de su ARNm (Figura 25A).

Con el fin de comprobar si la inducción de COX-1 por 9cisRA requería de la síntesis de proteínas, tratamos las células RAW264.7 con 9cisRA en combinación cicloheximida (CHX) como inhibidor de la síntesis proteica o con actinomicina D (Act.D) como inhibidor transcripcional. Como control, analizamos la expresión de CCL9, del que se conoce que se activa a nivel transcripcional de forma directa por el ligando 9cisRA (Núñez, V., *et al.*, 2010). Comprobamos que el tratamiento con Act.D previene el incremento en los niveles de ARNm en ambos casos. Sin embargo, la inducción de CCL9 por 9cisRA no se ve afectada en presencia de CHX, mientras que el aumento de expresión de ARNm de COX-1 se anula tras la inhibición de la síntesis de proteínas. Estos resultados indicarían que la inducción de COX-1 por ligandos de RXR se produce de forma indirecta y por tanto requiere de la síntesis de una proteína intermediaria (Figura 25B). El tratamiento con CHX a diferentes tiempos tras la estimulación con 9cisRA, permitió definir que el efecto inhibitorio de la CHX respecto a la inducción de COX-1 por 9cisRA se reduce a medida que el tratamiento con CHX se produce de forma más tardía con respecto a la inducción con 9cisRA. Los resultados obtenidos permiten estimar que

se requiere la síntesis *de novo* de proteínas en las primeras 2 horas tras el tratamiento con 9cisRA para la inducción de COX-1 (Figura 25C).

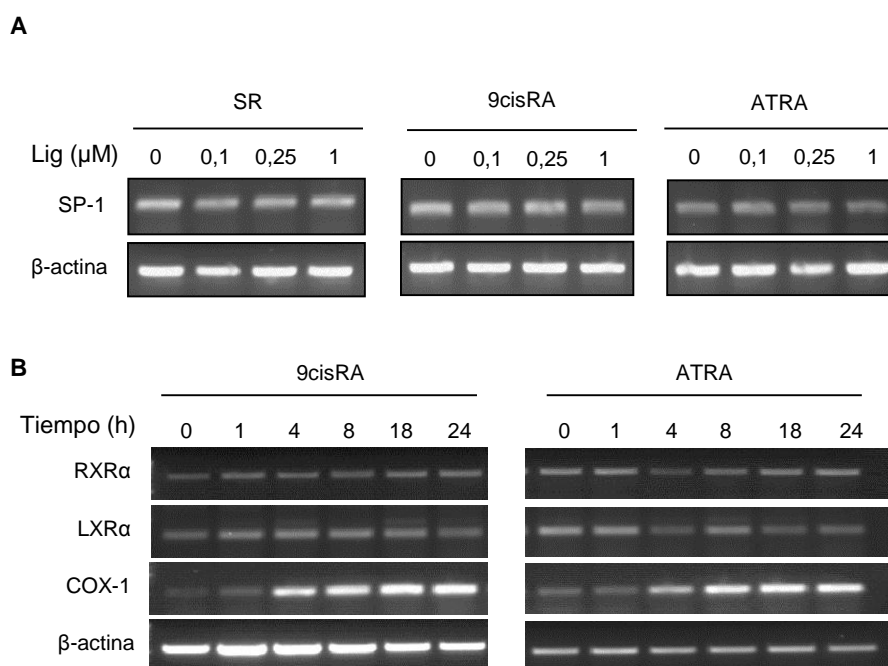


**Figura 25: Análisis del mecanismo de trans-activación de COX-1 por 9cisRA en células RAW264.7: requerimiento de síntesis protéica y efectos sobre la estabilidad de su ARNm**

**A**, Determinación de la vida media ( $T_{1/2}$ ) del ARNm de COX-1 mediante *RT-PCR* cuantitativa. Las células RAW264.7 se estimularon con ácido 9-cis retinoico (9cisRA, 0,2  $\mu$ M) durante 6 horas, tras lo cual ( $t=0$ ) se trataron con actinomicina D (Act.D, 5  $\mu$ g/ml) en presencia o ausencia de 9cisRA (0,2  $\mu$ M) durante los tiempos indicados. Los valores se normalizaron por la expresión del gen endógeno 18S y se muestran como porcentaje respecto a los niveles de ARNm de COX-1 a  $t=0$ . **B**, Análisis por *RT-PCR* de la expresión de COX-1 y CCL9 en células RAW264.7 tratadas con 9cisRA (0,2  $\mu$ M) durante 5 horas en presencia o ausencia de cicloheximida (CHX, 5  $\mu$ g/ml) o Act.D (5  $\mu$ g/ml). Como control se muestran los niveles de  $\beta$ -actina. **C**, Análisis mediante *RT-PCR* del efecto de la CHX sobre la inducción de la expresión de COX-1 por 9cisRA. Las células RAW264.7 se trataron con 9cisRA (0,2  $\mu$ M) durante 5 horas, añadiéndose CHX (5  $\mu$ g/ml) al mismo tiempo (0h) o tras 1 (1h), 2 (2h), 3 (3h) o 4 horas (4h) respecto a la estimulación inicial con 9cisRA.

Teniendo en cuenta estos resultados, y tras estudiar los posibles factores de transcripción implicados en la inducción de COX-1 descritos en la literatura, analizamos los efectos del 9cisRA sobre la expresión de SP-1, como uno de los factores de transcripción esenciales en la regulación de la expresión de COX-1 (Kang, Y.-J., *et al.*, 2007). Como se muestra en la figura 26, ninguno de los ligandos de RXR/RAR produjo un cambio sustancial sobre los niveles de ARNm de SP-1 a las dosis ensayadas (Figura 26A).

Por otra parte, también quisimos descartar que la inducción de COX-1 por 9cisRA o ATRA estuviera mediada por un aumento en la expresión del receptor RXR $\alpha$ , estudiando su expresión a nivel de ARNm. Como se muestra en la figura 26B, el tratamiento con estos ligandos durante diferentes tiempos indujo la expresión de COX-1, pero no produjo un efecto significativo sobre los niveles de ARNm de RXR $\alpha$ , ni tampoco de LXR $\alpha$  en células RAW264.7.



**Figura 26: La inducción de COX-1 por efecto de ligandos de RXR/RAR en células RAW264.7 no implica cambios en la expresión de SP-1 ni en la del receptor RXR $\alpha$**

Las células RAW264.7 se trataron con ácido 9-cis retinoico (9cisRA), SR11237 (SR) o ácido *all-trans* retinoico (ATRA) según se indica. **A**, Análisis por *RT-PCR* del efecto de dosis crecientes (0,1 a 1 μM) de los diferentes ligandos (Lig) durante 18 horas sobre la expresión del factor de transcripción SP-1. **B**, Análisis mediante *RT-PCR* de la expresión de COX-1 y de los receptores RXR $\alpha$  y LXR $\alpha$  en células RAW264.7 tras el tratamiento con 9cisRA o ATRA (0,1 μM) durante los tiempos indicados. En todos los casos se muestran los niveles de ARNm de β-actina como control.

En conclusión, los resultados obtenidos ponen de manifiesto un efecto inductor sobre la expresión de COX-1 debido a la acción de ligandos de RXR y RAR en macrófagos. Este efecto tiene lugar a nivel transcripcional y se traduce en un aumento de su ARNm y proteína, que llevan a un incremento en la síntesis de PGE<sub>2</sub>. El aumento de expresión de esta isoforma de la ciclooxigenasa mediado por 9cisRA se produce de forma indirecta, dependiendo de la síntesis *de novo* de una o varias proteínas que determinan el efecto inductor de los ligandos.

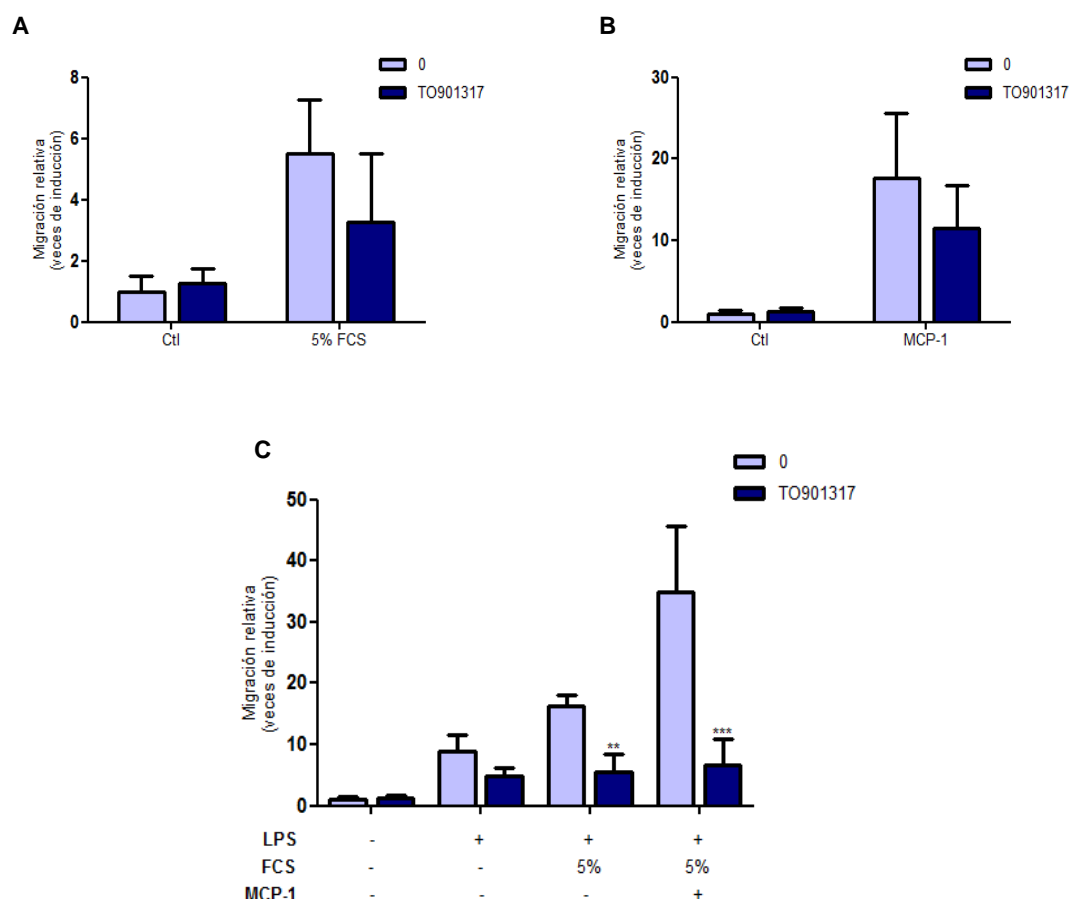
### 3.- Efectos de la activación de receptores LXR sobre la migración de macrófagos

Además de la señalización mediante producción de mediadores inflamatorios como los prostanoïdes, otra de las características que determinan el desarrollo de los procesos inflamatorios es la acumulación de células del sistema inmune (Kim, H.S., *et al.*, 2012). El potencial papel que juegan los receptores LXR en la migración de células inmunes, y su relevancia en las acciones anti-inflamatorias de los mismos no se conoce en detalle hasta la fecha. En este sentido, decidimos estudiar la posible acción de los receptores LXR a este nivel, comprobando su implicación en la regulación de los procesos de migración en macrófagos. En primer lugar, realizamos ensayos de migración frente a diferentes estímulos, utilizando placas “*transwell*” con células RAW264.7 cultivadas en presencia o ausencia del ligando de LXR TO901317.

Mediante estos ensayos de migración *in vitro* observamos que un incremento del porcentaje de suero en el medio de cultivo de la cámara inferior, fue suficiente para inducir la migración de células RAW264.7, migración que se vió reducida en el caso de células tratadas previamente con TO901317 (Figura 27A). Por otra parte, y como muestra la figura 27B, en el caso de la utilización de la quimioquina MCP-1 como estímulo quimiotáctico, se produjo una mayor inducción de la migración de macrófagos, que también se vió reducida sustancialmente mediante el tratamiento con el ligando de LXR.

A continuación, analizamos los efectos de la activación de receptores LXR sobre la migración de macrófagos estimulados previamente durante dos horas con LPS (Figura 27C). Se comprobó que el tratamiento con LPS induce la migración de células RAW264.7 y dicha inducción se incrementa en respuesta a un incremento de suero en el medio de cultivo de la cámara inferior. Además, este aumento en la migración relativa fue mayor cuando se combinaron tanto el estímulo quimiotáctico MCP-1 como las diferencias de suero en el medio de migración. En células sometidas a los ensayos de migración en cualquiera de estas circunstancias en presencia de TO901317, se observó una reducción significativa en la respuesta a los estímulos quimiotácticos y por tanto una menor migración de las células RAW264.7 mediada por activación de receptores LXR.



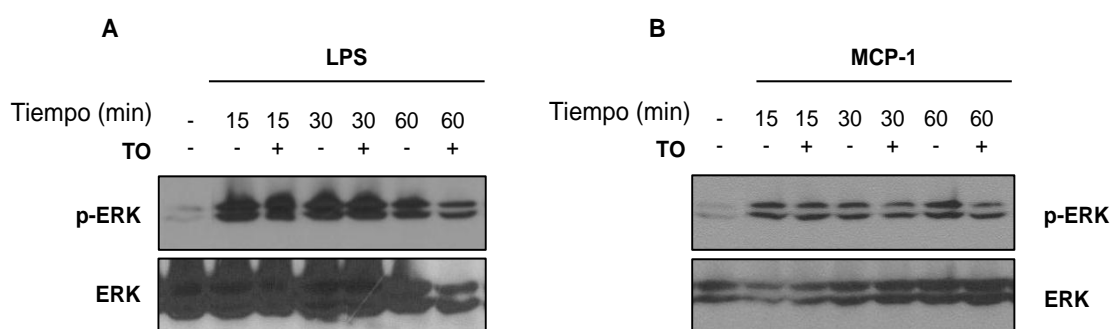


**Figura 27: Efecto del ligando de LXR TO901317 sobre la migración de células RAW264.7**

Las células RAW264.7 se sometieron a 5 horas de migración en cámaras “transwell” en respuesta a 5% de suero de ternera fetal (FCS) (**A**) o en respuesta a MCP-1 (50 ng/ml) (**B**). A continuación, se analizó la migración relativa en presencia o ausencia del ligando TO901317 (1  $\mu$ M). **C**, Células RAW264.7 estimuladas con LPS (1  $\mu$ g/ml) durante 2 horas previas a someterlas durante 5 horas a migración en respuesta a 5% FCS o a 5% FCS + MCP-1. Los resultados de un experimento representativo llevado a cabo por triplicado se muestran como migración relativa ( $n^{\circ}$  células migradas en la muestra /  $n^{\circ}$  células migradas en el control (Ctl)) en veces de inducción  $\pm$  SD. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  respecto a la migración en ausencia de TO.

Considerando los resultados obtenidos, quisimos analizar si los efectos del ligando TO901317 sobre la migración de células RAW264.7 podía implicar una reducción en la señalización a partir de la activación de quinasas como por ejemplo ERK. Con este objetivo estudiamos mediante *Western blot* con anticuerpos específicos frente a ERK y a la forma fosforilada de la misma, la expresión de esta quinasa y de p-ERK tras la estimulación de las células RAW264.7 con LPS (Figura 28A) o MCP-1 (Figura 28B). Ambos estímulos produjeron un aumento en la fosforilación de ERK ya desde los 15 minutos de tratamiento pero, en ningún caso se observaron cambios significativos debidos a la incubación con el ligando de LXR.





**Figura 28: Efectos de la activación de receptores LXR sobre la activación de la quinasa ERK en macrófagos**

Las células RAW264.7 se mantuvieron en cultivo en presencia o ausencia del ligando de LXR TO901317 (TO) (1  $\mu$ M) durante una hora antes de su estimulación durante los tiempos indicados con LPS (1  $\mu$ g/ml) **(A)** o MCP-1 (50 ng/ml) **(B)**. Las figuras muestran *Western blots* representativos del análisis de los niveles de proteína ERK total y de ERK fosforilada (p-ERK) en cada caso.

A la vista de los datos obtenidos podemos concluir que la activación de receptores LXR tras la incubación con ligandos específicos, además de reprimir la expresión de genes pro-inflamatorios, es capaz de ejercer acciones anti-inflamatorias mediante su implicación en la modulación de los procesos de migración de macrófagos. En este sentido, hemos observado una disminución en la migración de células RAW264.7 debida al tratamiento con ligandos de LXR, que no implica cambios en la expresión o activación de ERK.

#### 4.- Efectos de la activación de receptores LXR en un modelo murino de aneurisma aórtico abdominal

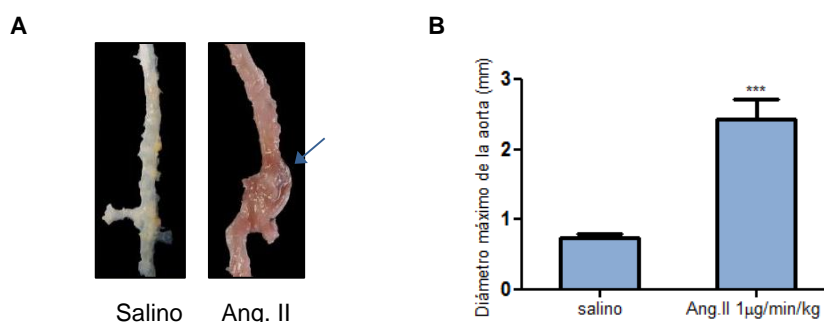
Los resultados mostrados hasta el momento, junto con los trabajos descritos en la literatura al respecto, ponen de manifiesto la importancia potencial de las acciones anti-inflamatorias de la activación de receptores LXR a través de la modulación de la expresión de genes implicados en el proceso inflamatorio. Este hecho, junto con las propiedades de los LXRs sobre la modulación del transporte y el metabolismo del colesterol hace que el estudio de los mecanismos de acción de estos receptores adquiera una importante relevancia en cuanto a su potencial terapéutico en enfermedades en las que existe un componente inflamatorio junto con alteraciones en el metabolismo del colesterol (Zelcer, N. and Tontonoz, P., 2006). En este sentido, en el desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares como por ejemplo la aterosclerosis o el aneurisma aórtico abdominal (AAA), son determinantes diversos

factores como los defectos en el metabolismo del colesterol y su acumulación, pero también procesos inflamatorios que favorecen la progresión y severidad de las lesiones (Miyake, T. and Morishita, R., 2009). Desde este punto de vista y a la vista de nuestros resultados previos *in vitro*, el siguiente objetivo de esta tesis doctoral ha sido el estudio de los efectos de la activación de receptores LXR en un modelo de ratón de AAA.

#### 4.1. Caracterización del modelo de AAA en ratones ApoE<sup>-/-</sup>

Las lesiones que caracterizan el AAA se producen principalmente a nivel de la bifurcación renal de la aorta, produciéndose un aumento del diámetro aórtico y una desestructuración de la lámina elástica, lo que favorece la ruptura de la pared de la aorta en fases avanzadas de la enfermedad. El desarrollo de las lesiones de aneurisma aórtico cursa con un componente inflamatorio asociado, de forma que se ha descrito un aumento en la expresión de genes pro-inflamatorios e infiltración de células inmunes en el tejido aórtico (Shimizu, K., *et al.*, 2006).

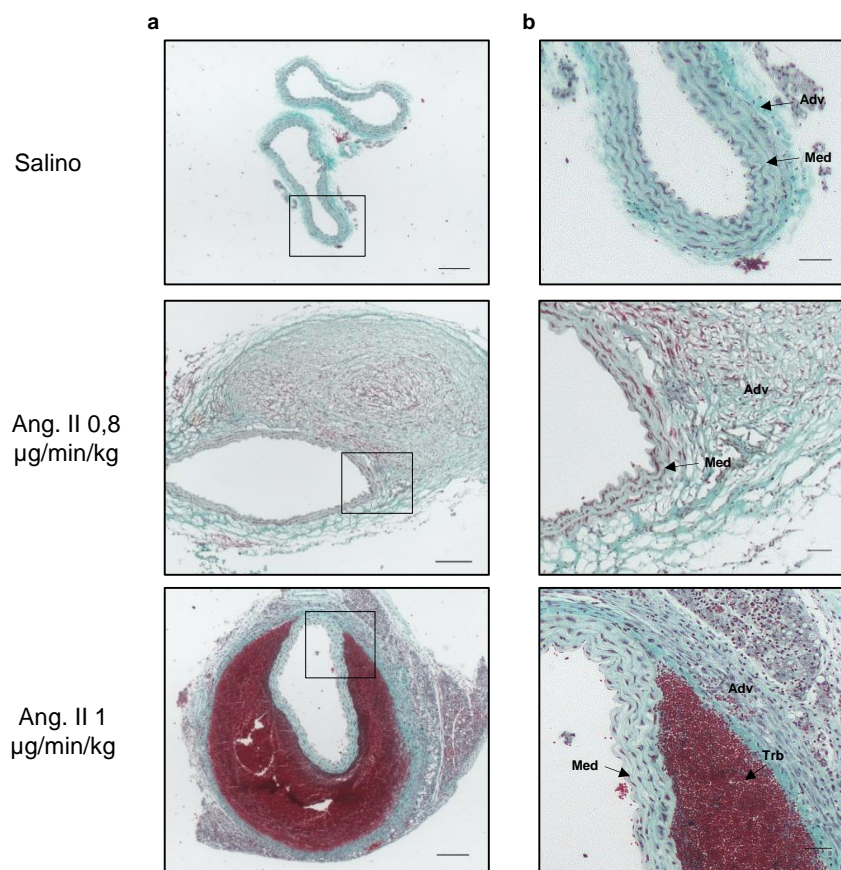
El modelo de AAA en ratón utilizado consiste en la implantación de bombas osmóticas subcutáneas que difunden constantemente angiotensina II (Ang.II) (0,8 a 1 µg/min/Kg) durante 28 días en ratones KO para el gen de la apolipoproteína E (ApoE), lo que lleva a la formación de lesiones de aneurisma aórtico abdominal con alta incidencia y de diferentes grados de desarrollo (Daugherty, A. and Cassis, L.A., 2004). La figura 29A ilustra con un ejemplo la estructura macroscópica de una aorta normal de un ratón infundido con solución salina, en comparación con la de una aorta con aneurisma proveniente de un ratón ApoE<sup>-/-</sup> tratado con Ang.II. La flecha en la figura de la aorta de un ratón infundido con Ang.II indica la formación del aneurisma como la dilatación evidente del vaso aórtico a nivel de la bifurcación renal. La cuantificación del diámetro de las lesiones presentes en un grupo de ratones tratados con Ang.II pone de manifiesto el aumento en el diámetro de la aorta en la zona de la lesión del orden de 2,5 veces (Figura 29B).



**Figura 29: Inducción de aneurismas aórticos abdominales en aortas de ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II**

Los ratones ApoE<sup>-/-</sup> fueron infundidos con Ang.II (1 µg/min/kg) o solución salina mediante bombas osmóticas subcutáneas durante 28 días. A continuación se examinaron las aortas de estos ratones. **A**, Fotografía representativa de la dilatación aórtica en ratones infundidos con Ang.II en comparación con el control (salino). **B**, Determinación del diámetro máximo de la aorta en ratones tratados con Ang.II respecto al grupo control (salino). Se muestra la media del diámetro en mm  $\pm$  SD. \*\*\*  $p < 0,001$ . ( $n_{\text{sal}} = 3$ ,  $n_{\text{AngII}} = 4$ ).

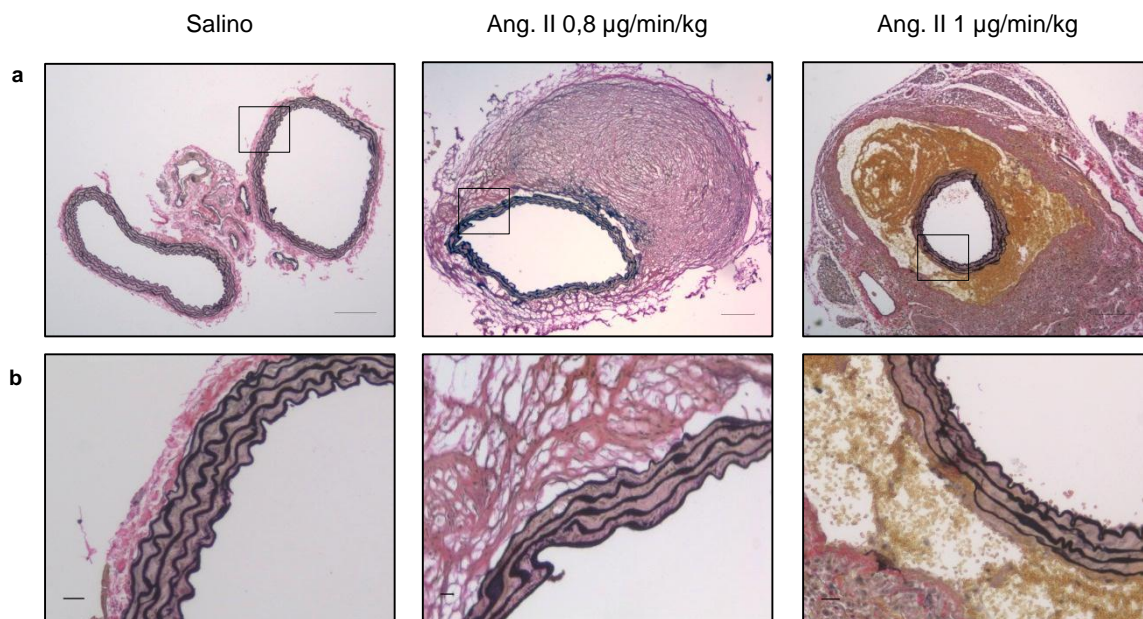
El análisis histológico de las lesiones de AAA permite obtener una información más detallada de las alteraciones a nivel morfológico en las distintas capas de la pared aórtica en comparación con la estructura de la pared aórtica de los animales infundidos con solución salina. La tinción tricrómica de Masson en cortes transversales de las aortas muestra un incremento en el grosor de la capa adventicia de los ratones infundidos con Ang.II, con un aumento en la celularidad, debido en gran parte a la infiltración de células inmunitarias (Figura 30). En algún caso se producen lesiones de grado avanzado, en las que se observa la aparición de trombos como consecuencia de la ruptura de la estructura del vaso.



**Figura 30: Análisis histológico de la pared aórtica en las lesiones de AAA de ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II.**

Tinción tricrómica de Masson en cortes transversales de aortas de ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II o solución salina durante 28 días. Se muestran imágenes representativas por grupo de tratamiento de dos experimentos independientes donde  $n_{\text{sal}} = 4$ ,  $n_{\text{Ang } 0.8} = 6$ ,  $n_{\text{Ang } 1} = 2$ . Las barras de escala representan 200  $\mu\text{m}$  (a) o 50  $\mu\text{m}$  (b). Med., túnica media; Adv., túnica adventicia; Trb, trombo.

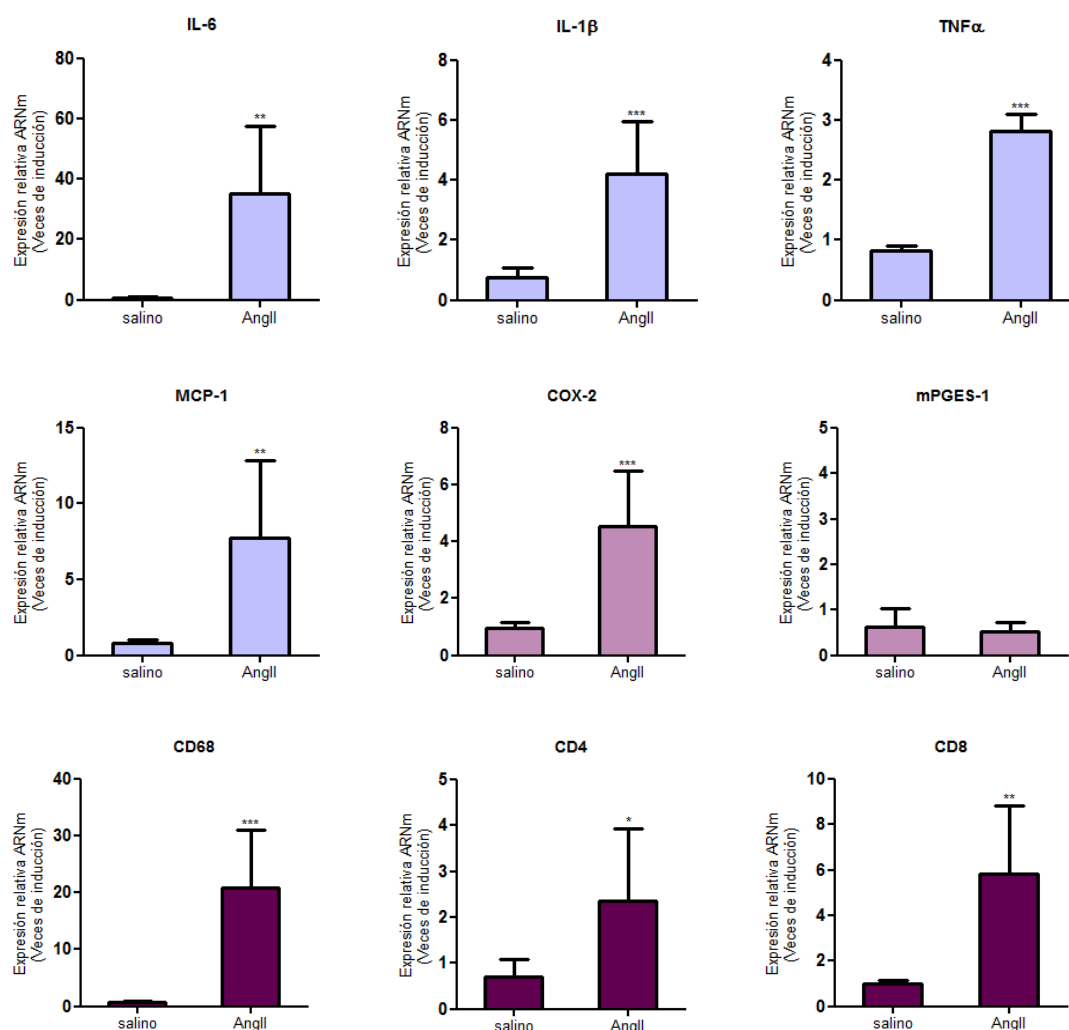
Por otra parte, los efectos del tratamiento sobre la estructura de la lámina elástica se comprobaron realizando tinciones de Verhoeff-Van Gieson (VVG) en cortes transversales de las aortas de estos ratones. Como se muestra en la figura 31, mientras que en los ratones control existe una disposición ordenada de esta lámina, en ratones infundidos con angiotensina II se pierde la estructura ondulada uniforme de la misma, estirándose y mostrando rupturas o discontinuidad en algunos casos.



**Figura 31: Efecto de la infusión de angiotensina II sobre la lámina elástica en las lesiones de AAA de aortas de ratones ApoE<sup>-/-</sup>:**

Tinción de la lámina elástica VVG, en cortes transversales de aortas de ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II o solución salina durante 28 días. Se muestran imágenes representativas por grupo de tratamiento de dos experimentos independientes donde  $n_{\text{sal}} = 4$ ,  $n_{\text{Ang } 0.8} = 6$ ,  $n_{\text{Ang } 1} = 2$ . Las barras de escala representan 200  $\mu\text{m}$  (a) o 50  $\mu\text{m}$  (b).

Con el fin de estudiar el proceso inflamatorio asociado a las lesiones de AAA en este modelo experimental, se procedió al análisis mediante *RT-PCR* cuantitativa de la expresión de genes implicados en inflamación como citoquinas y quimioquinas, enzimas de la vía de síntesis de prostanoïdes y marcadores de células inmunitarias, como linfocitos y macrófagos. Tras los 28 días de tratamiento con Ang.II, se detectó un aumento significativo de expresión de las citoquinas IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  así como de la quimioquina MCP-1. Por otro lado, mientras que la expresión de la COX-2 se encuentra incrementada en las lesiones de AAA, no se observaron diferencias en la expresión de la sintasa mPGES-1. En cuanto a la expresión de genes de marcadores celulares como CD68 (macrófagos), CD4, y CD8 (linfocitos T) pudimos observar un aumento de los mismos en las aortas de ratones infundidos con angiotensina II respecto a aquellos del grupo control, indicando un aumento en la infiltración de células inmunitarias en el tejido lesionado (Figura 32).



**Figura 32: Efecto de la infusión de angiotensina II sobre la expresión génica en lesiones de AAA de aortas de ratones ApoE<sup>-/-</sup>**

Análisis mediante *RT-PCR* cuantitativa de la expresión de IL-6, IL-1β, TNFα, MCP-1, COX-2, mPGES-1, CD68, CD4 y CD8 en aortas de ratones ApoE<sup>-/-</sup> tratados con angiotensina II (n=4) o solución salina (n=2) durante 28 días. Los resultados se muestran como veces de inducción (expresión relativa de ARNm en aortas de ratones del grupo infundido con Ang.II / expresión relativa de ARNm del grupo control infundido con salino) ± SD. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

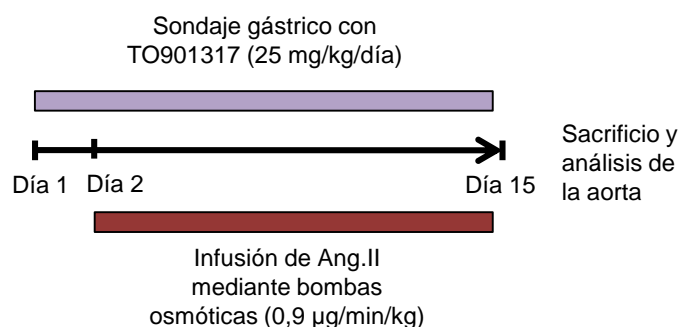
#### 4.2. Efecto del tratamiento con el ligando TO901317 en ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II

Con el fin de analizar los efectos de la activación de receptores LXR *in vivo* en el modelo murino de AAA, se administró, mediante sonda gástrica, el ligando TO901317 (25 mg/día/Kg) diluido en DMSO y preparado en una emulsión con carboximetilcelulosa (CMC), o el correspondiente vehículo (DMSO en CMC) en el caso de los grupos sin



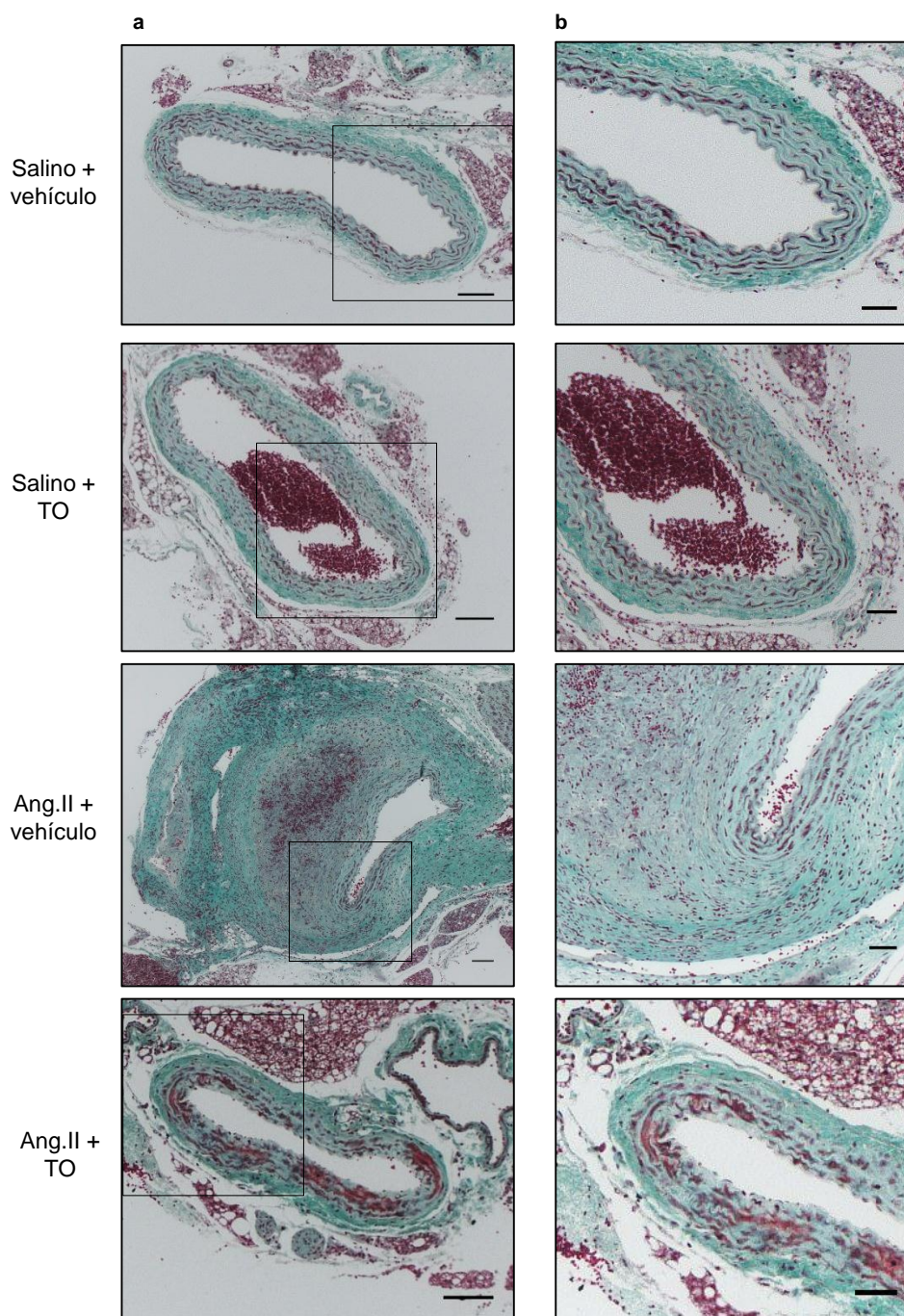
tratamiento con el ligando de LXR, tanto en animales infundidos con solución salina como en aquellos infundidos con Ang.II (0,9 µg/min/Kg). Como muestra el esquema en la figura 33, el tratamiento comenzó un día antes de la implantación de las bombas osmóticas utilizadas para difundir Ang.II o solución salina en ratones ApoE<sup>-/-</sup>. Transcurridos 15 días de sondaje diario con TO901317 o vehículo, en ratones infundidos con Ang.II o con solución salina, según los grupos experimentales, se procedió al análisis de las lesiones de aneurisma en la aorta.

**Figura 33: Esquema de la pauta de tratamiento con TO901317 en el modelo de AAA en ratones ApoE<sup>-/-</sup>**



No se observó formación de aneurisma a nivel macroscópico en ninguno de los animales infundidos con solución salina, ya fueran tratados con vehículo (n=2) o con el ligando de LXR (n=2). En cuanto a los grupos de animales infundidos con Ang.II, en el caso de aquellos tratados con vehículo (n=6), todos ellos desarrollaron lesiones de aneurisma evidentes a nivel macroscópico, lo que llevó incluso a la muerte de dos de ellos antes del sacrificio (excluidos del análisis posterior). La formación de lesiones de aneurisma de un grado que pudiera ser evidente a través de la dilatación de la aorta a nivel macroscópico sólo se observó en el caso de 2 animales de los 4 tratados con TO901317 e infundidos con Ang.II, lo que indicaría una menor incidencia de AAA en estos últimos.

El análisis histológico mediante tinción tricrómica de Masson en cortes transversales de las aortas, confirmó la ausencia de lesiones de aneurisma en los ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con salino. En las aortas de los animales del grupo tratado con Ang.II en ausencia de TO901317 se observó un evidente aumento del diámetro de la aorta y del grosor de la pared aórtica con infiltración celular. En el caso de aquellos ratones infundidos con Ang.II y tratados con el ligando de LXR que no desarrollaron un aneurisma apreciable nivel macroscópico, si bien mostraron ciertas alteraciones histológicas con respecto al control, no se observó un aumento evidente del diámetro de la pared aórtica y del grosor de la capa adventicia (Figura 34).

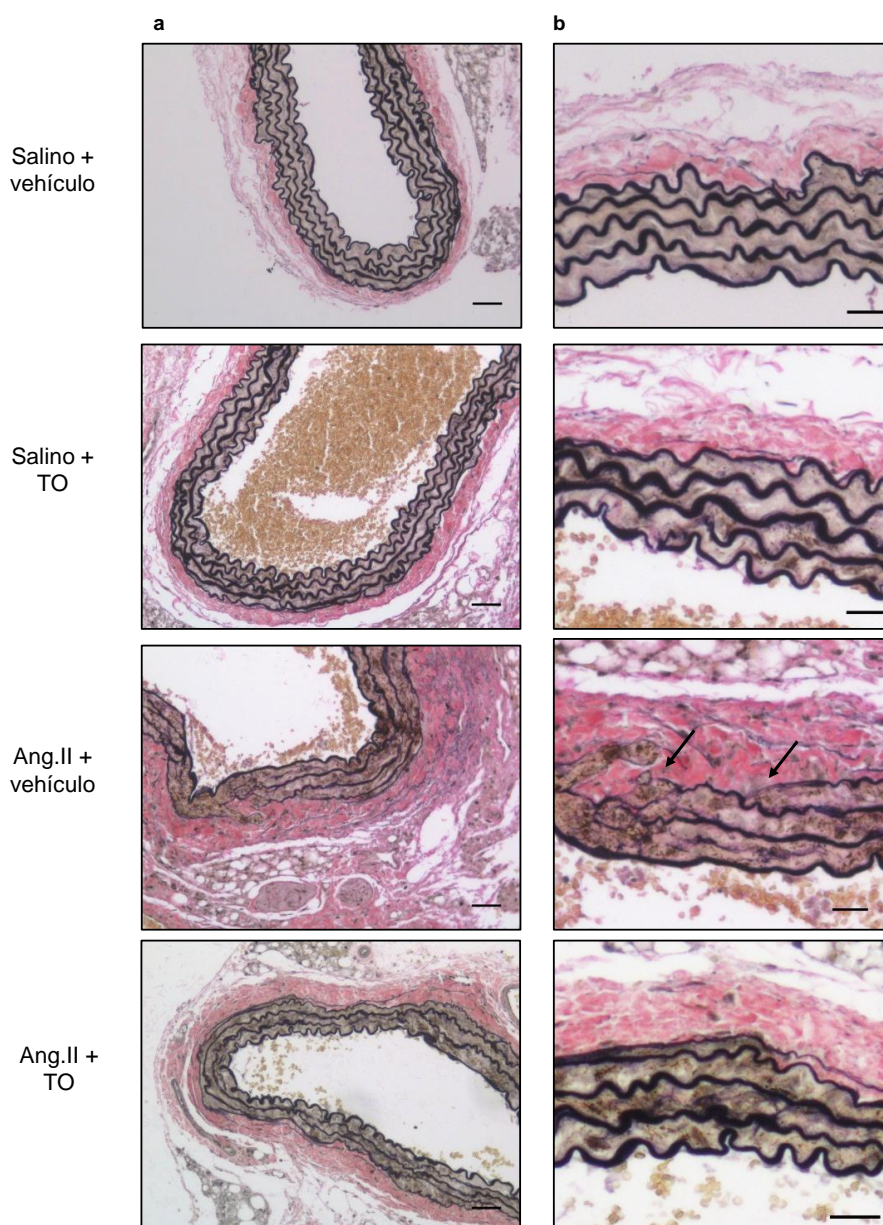


**Figura 34: Análisis histológico del efecto del tratamiento con TO901317 sobre la formación de AAA en ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II**

Tinción tricrómica de Masson en cortes transversales de lesiones de AAA en aortas de ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II o solución salina y tratados con TO901317 o vehículo durante 15 días. Se muestran imágenes representativas por grupo de tratamiento. La barra de escala representa 100 µm en **a**, y 50 µm en **b**. ( $n_{\text{sal}} = 2$ ,  $n_{\text{sal+TO}} = 2$ ,  $n_{\text{angII}} = 4$ ,  $n_{\text{angII+TO}} = 4$ ).



El examen de la estructura de la lámina elástica de la aorta mediante la tinción de los cortes histológicos con el reactivo de tinción Verhoeff-Van Gieson, permitió observar que, mientras que las aortas de los ratones de los grupos infundidos con salino (con o sin TO901317) presentan una estructura intacta de la lámina elástica, ésta pierde su estructura plegada e incluso muestra roturas en los animales infundidos con Ang.II y tratados con vehículo.

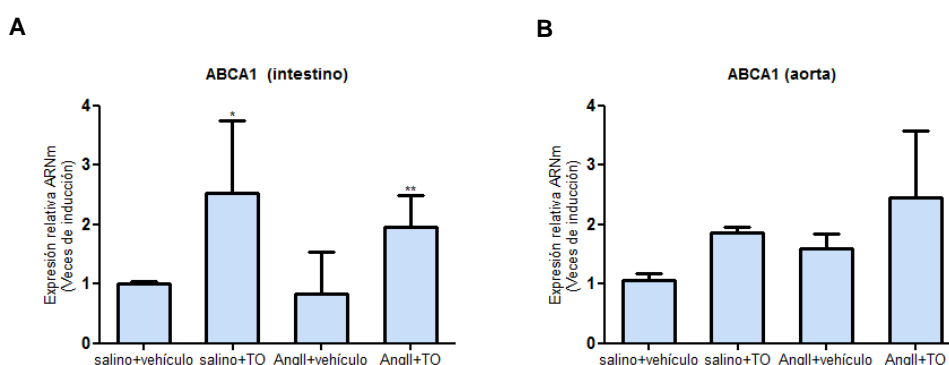


**Figura 35: Efecto del tratamiento con TO901317 sobre la estructura de la lámina elástica de ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II**

Tinción de VVG de la lámina elástica en cortes transversales de lesiones de AAA en aortas de ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II o solución salina y tratados con TO901317 o vehículo durante 15 días. Se muestran imágenes representativas por grupo de tratamiento. Las flechas indican rupturas de la lámina elástica. La barra de escala representa 100  $\mu$ m en **a**, y 50  $\mu$ m en **b**. ( $n_{\text{sal}} = 2$ ,  $n_{\text{sal+TO}} = 2$ ,  $n_{\text{angII}} = 4$ ,  $n_{\text{angII+TO}} = 4$ ).

En los animales infundidos con Ang.II y tratados con TO901317 que no desarrollaron un aneurisma evidente a nivel macroscópico, las alteraciones en la lámina elástica fueron menores, de forma que, si bien se perdió parte del plegamiento sobre todo en las capas más internas, en general, se mantuvo la organización de la elástica más intacta e íntegra que en el grupo de Ang.II + vehículo (Figura 35).

Con el fin de estudiar los efectos del tratamiento con TO901317 *in vivo* en cuanto a la regulación de la expresión génica en aorta, analizamos mediante *RT-PCR* cuantitativa la expresión de un grupo de genes de interés en cada uno de los grupos de animales. En primer lugar, comprobamos si la administración del ligando producía un aumento en la expresión de activación de transportadores de colesterol como ABCA1, de la misma forma que ocurre *in vitro*. Como se muestra en la figura 36, el ligando TO901317 indujo un aumento significativo en la expresión de ABCA1 en el intestino de los ratones, tanto en los infundidos con salino, como en los tratados con Ang.II. En las muestras de aorta existe una tendencia al aumento en la expresión de ABCA1 en respuesta al tratamiento con TO901317, si bien no llega a ser estadísticamente significativo. Estos resultados indicarían la efectividad del tratamiento *in vivo* con el ligando TO901317.

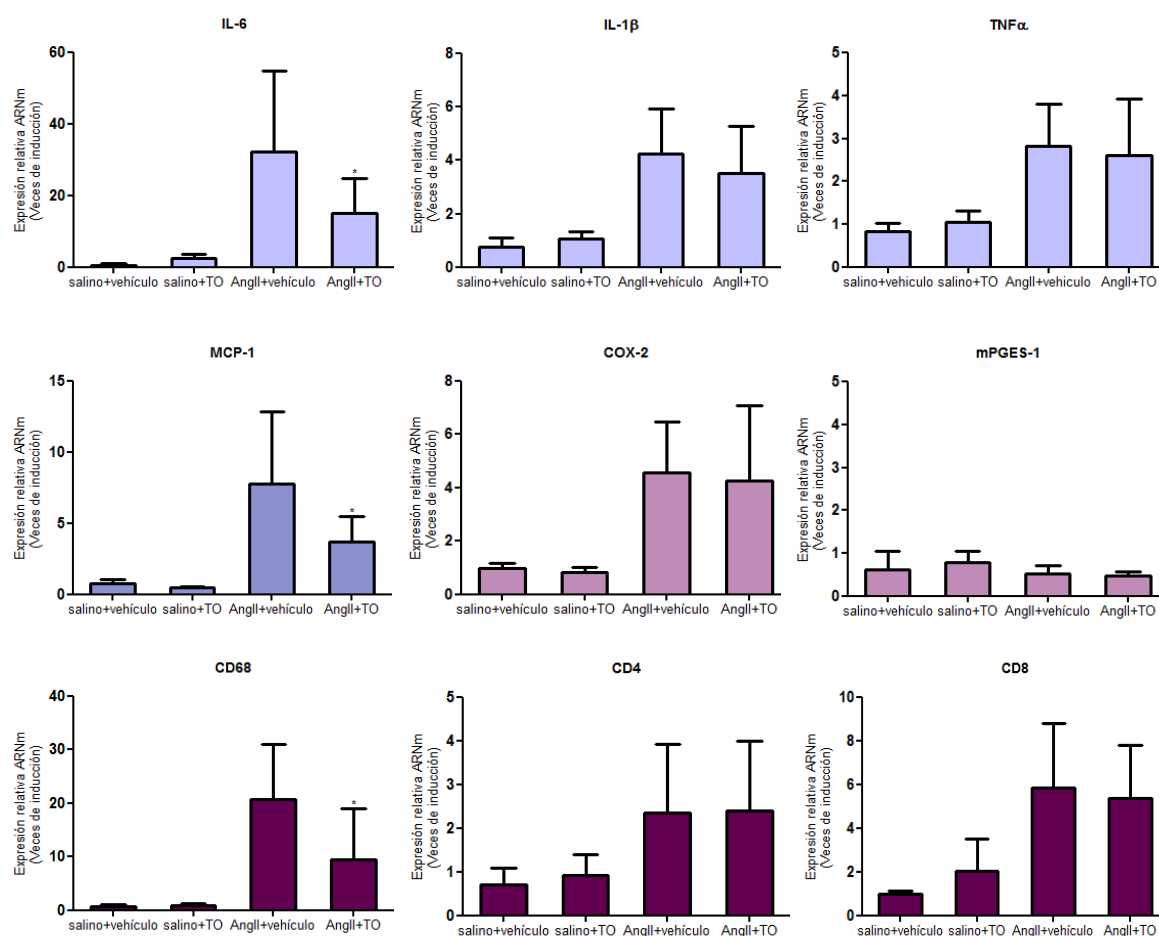


**Figura 36: Efecto del tratamiento con TO901317 sobre la expresión de ABCA1 en ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con Ang.II**

Análisis mediante *RT-PCR* cuantitativa de la expresión de ABCA1 en intestino (A) y aorta (B) de ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II o solución salina y tratados con TO901317 o vehículo durante 15 días. Los resultados se muestran como veces de inducción (expresión relativa de ARNm en el grupo de tratamiento / expresión relativa ARNm del grupo control)  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . ( $n_{\text{sal}} = 2$ ,  $n_{\text{sal+TO}} = 2$ ,  $n_{\text{angII}} = 4$ ,  $n_{\text{angII+TO}} = 4$ ).

Como se mostró en la figura 32, en las lesiones de aneurisma se produce un aumento en la expresión de ciertos genes pro-inflamatorios como IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ,

MCP-1 y COX-2, así como de marcadores de células inmunes como CD68, CD4 y CD8. El análisis del efecto del tratamiento con el ligando de LXR en la expresión de estos genes en cada uno de los grupos experimentales de ratones se muestra en la figura 37. En ella se puede apreciar como el tratamiento con TO901317 en los ratones infundidos con salino no altera sustancialmente la expresión de estos genes con respecto al control. En cuanto a los resultados obtenidos en los animales infundidos con Ang.II y tratados con este ligando, se observó una disminución significativa de la inducción de IL-6, MCP-1 y CD68 con respecto al grupo Ang.II + vehículo, sin que se produjeran alteraciones significativas en la expresión de otros genes como TNF $\alpha$ , COX-2, mPGES-1, CD4 o CD8.



**Figura 37: Efecto del tratamiento con TO901317 sobre la expresión génica en aortas de ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con Ang.II**

Determinación mediante *RT-PCR* cuantitativa de la expresión de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , MCP-1, COX-2, mPGES-1, CD68, CD4 y CD8 en las lesiones de AAA de aortas de ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II o solución salina y tratados con TO901317 o vehículo durante 15 días. Los resultados se muestran como veces de inducción (expresión relativa ARNm en aortas del grupo de tratamiento / expresión relativa ARNm en aortas del grupo control)  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ . ( $n_{\text{sal}} = 2$ ,  $n_{\text{sal+TO}} = 2$ ,  $n_{\text{angII}} = 4$ ,  $n_{\text{angII+TO}} = 4$ ).

En conjunto, los resultados obtenidos indicarían que, tanto la incidencia como la severidad de las lesiones aórticas se reducen en respuesta al tratamiento con el ligando de LXR TO901317 en el modelo murino de AAA. Existiría a su vez una menor infiltración de células inmunitarias, esencialmente macrófagos en el área de la lesión, con una disminución de la expresión de ciertos genes pro-inflamatorios como aquellos que codifican para citoquinas inflamatorias como IL-6, así como quimioquinas como MCP-1.

## ***DISCUSIÓN***

---



## 1.- Efectos de la activación de receptores LXR sobre la expresión génica en macrófagos

### 1.1. Expresión de receptores LXR e inducción de genes diana en macrófagos

Los receptores LXR pueden modular de forma positiva la transcripción génica, mediante un mecanismo denominado de trans-activación. Tras la unión de un ligando específico al receptor, se produce un cambio conformacional que permite el intercambio de moléculas co-represoras por co-activadores, en el complejo formado por los receptores unidos a sus elementos de respuesta en el ADN (LXRE), induciendo la expresión de los genes diana (Baranowski, M., 2008; Töröcsik, D., *et al.*, 2009). Entre los factores que determinan la activación de la transcripción génica vía LXR se encuentra la propia expresión de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de estos receptores, así como la disponibilidad de moléculas co-reguladoras y ligandos, que pueden variar en función del tipo celular o tejido estudiados (Albers, M., *et al.*, 2006; Phelan, C.A., *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta la participación de los receptores LXR en la regulación, tanto del metabolismo del colesterol como del desarrollo de procesos inflamatorios, este trabajo se ha centrado en el papel de los LXRs en un tipo celular que participa activamente en ambas vías, como es el macrófago.

La relevancia de la regulación transcripcional por LXRs en macrófagos se ha descrito anteriormente en la literatura (Chinetti-Gbaguidi, G. and Staels, B., 2009; Rigamonti, E., *et al.*, 2008). La activación de receptores LXR tiene un papel esencial en la función reguladora de los macrófagos sobre el metabolismo del colesterol, promoviendo un aumento en el transporte reverso de colesterol mediante la inducción de la expresión de diversos genes que codifican tanto para aceptores (como apolipoproteína E), como para transportadores de colesterol (transportadores ABC) (Calkin, A.C. and Tontonoz, P., 2012; Chinetti-Gbaguidi, G. and Staels, B., 2009; Kim, G.H., *et al.*, 2009; Zhao, C. and Dahlman-Wright, K., 2010).

En nuestros estudios, realizados tanto en las líneas celulares tipo monocito-macrófago de ratón (RAW264.7) y humanas (THP-1), así como en macrófagos peritoneales de ratón, comprobamos que ambas isoformas de LXR se expresan en estas células, siendo capaces de actuar como reguladores de la transcripción génica en respuesta al tratamiento con ligandos específicos como TO901317, GW3965 o 25-hidroxicolesterol. De tal forma, el tratamiento con estos ligandos indujo la activación transcripcional mediada por elementos LXRE en ensayos luciferasa, así como la

inducción de genes diana conocidos como ABCA1 y ABCG1, en los tres tipos de células analizadas.

Los receptores LXR forman heterodímeros permisivos con los receptores RXR (*retinoid X receptors*) y de esta forma son funcionales y pueden ejercer su efecto regulador sobre la expresión génica en macrófagos (Edwards, P.A., *et al.*, 2002; Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M., 1995; Willy, P.J., *et al.*, 1995). De acuerdo con ello, en este trabajo comprobamos que, si bien tanto ligandos RXR como ligandos LXR son capaces de inducir la expresión génica a través de elementos de respuesta a LXR en el ADN (LXREs) de forma independiente, la combinación de ambos tipos de ligandos produce un incremento sustancial de dicha inducción. A su vez, la sobre-expresión, tanto de RXR $\alpha$ , como de LXR $\alpha$ , incrementa significativamente la activación transcripcional mediada por elementos LXRE en células RAW264.7.

## **1.2. Represión de la expresión de COX-2 y mPGES-1 inducidas por LPS en macrófagos**

Los efectos anti-inflamatorios de la activación de receptores LXR en macrófagos se han estudiado ampliamente en los últimos años, abordándose desde diversas áreas de investigación como pueden ser los estudios sobre la influencia de LXR en apoptosis o generación de óxido nítrico (Im, S.-S. and Osborne, T.F., 2011; Joseph, S.B., *et al.*, 2004; Marathe, C., *et al.*, 2006), o aquellos centrados en los efectos sobre la expresión de genes pro-inflamatorios en respuesta a diferentes estímulos (Hong, C. and Tontonoz, P., 2008; Rigamonti, E., *et al.*, 2008; Zelcer, N. and Tontonoz, P., 2006). El tratamiento con ligandos de LXR promueve una disminución en la inducción de la expresión de genes implicados en el proceso inflamatorio, tales como iNOS, COX-2 o MCP-1 entre otros, en macrófagos tratados con LPS (Ghisletti, S., *et al.*, 2009; Ghisletti, S., *et al.*, 2007; Joseph, S.B., *et al.*, 2003; Ninomiya, Y., *et al.*, 2007; Yasuda, T., *et al.*, 2005).

En esta tesis doctoral hemos analizado las acciones anti-inflamatorias de los ligandos de LXR a través de sus efectos en macrófagos, comprobado la reducción en la respuesta a LPS en macrófagos tratados con ligandos de LXR, con una disminución en la inducción de la expresión de citoquinas como IL-6 e IL-1 $\beta$  y quimioquinas como MCP-1, en estas células. Nuestros estudios se han centrado en el análisis en detalle de las acciones de estos ligandos sobre la expresión de enzimas responsables de la producción exacerbada de prostanoïdes en macrófagos tras la activación con LPS como son la COX-2 y mPGES-1. Los prostanoïdes, entre los que se incluyen las diversas clases de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGI<sub>2</sub>) y los tromboxanos (TXs) juegan un papel esencial en el desarrollo del proceso inflamatorio (Tilley, S.L., *et al.*, 2001; Wang, M., *et*



*al.*, 2008b). Los macrófagos activados son los principales productores de prostanoïdes en el foco inflamatorio, lo que lleva a un incremento sustancial de la generación de PGE<sub>2</sub>, un potente mediador inflamatorio. La producción incrementada de esta prostaglandina por parte de los macrófagos tiene lugar esencialmente por la inducción coordinada de la expresión de COX-2 y de la sintasa mPGES-1 en respuesta a estímulos como el TNF $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  o el LPS (Linton, M.F. and Fazio, S., 2004; Matsumoto, H., *et al.*, 1997; Samuelsson, B., *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en nuestros estudios muestran que la inducción de la expresión de ambas enzimas tras el tratamiento con LPS se reduce sustancialmente en presencia de ligandos de receptores LXR en los diferentes tipos de células macrofágicas analizadas. Como consecuencia de la inhibición de la expresión de COX-2 y de mPGES-1 se produce una notable disminución en la producción de la prostaglandina PGE<sub>2</sub> por parte de estas células. A la vez, se detecta una reducción en la producción de otros prostanoïdes como PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  o TXB<sub>2</sub> que tendría lugar principalmente como consecuencia de la disminución de expresión de COX-2, en tanto en cuanto esta enzima regula el paso limitante en la producción de los diferentes tipos de prostanoïdes, ya que no se tiene constancia de variaciones en la expresión de las sintasas de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  o de TXB<sub>2</sub> en macrófagos. Como se discutirá más adelante, la expresión de la isoforma COX-1, si bien se modifica con el tratamiento con ligandos de RXR, no se ve alterada de forma significativa con el tratamiento con ligandos específicos de LXR.

En general, se acepta que las acciones anti-inflamatorias de los LXRs tienen lugar por un mecanismo denominado de trans-represión, por el cual, la activación de estos receptores interfiere con la actividad de factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión de genes inflamatorios. En particular, el factor de transcripción NF $\kappa$ B juega un papel esencial en la inducción transcripcional tanto de COX-2 como de mPGES-1 en macrófagos estimulados con LPS (Díaz-Muñoz, M.D., *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos confirman que, en los modelos celulares usados, efectivamente, la acción de los ligandos de LXR interfiere con la inducción transcripcional mediada por NF $\kappa$ B, de acuerdo con publicaciones previas (Castrillo, A., *et al.*, 2003; Joseph, S.B., *et al.*, 2003; Terasaka, N., *et al.*, 2005; Wu, S., *et al.*, 2009).

La regulación de la expresión de COX-2 y de mPGES-1 es compleja, de tal forma que, además de NF $\kappa$ B, otros factores participan de manera notable en su regulación. Trabajos recientes del laboratorio han puesto de manifiesto la importancia de la contribución del factor de transcripción Egr-1 en la inducción transcripcional de COX-2 y de mPGES-1 en macrófagos estimulados con LPS (Díaz-Muñoz, M.D., *et al.*, 2010). Los

resultados presentados en esta tesis doctoral aportan nuevos datos sobre las acciones de los LXRs a través de la interferencia sobre la activación transcripcional mediada por Egr-1. Este factor de transcripción incrementa su expresión rápidamente en macrófagos en respuesta a LPS. El tratamiento con ligandos de LXR, y más notablemente con ligandos de RXR, como se discutirá más adelante, disminuye sustancialmente tanto los niveles de inducción de la proteína Egr-1 como la activación transcripcional mediada por elementos de respuesta a este factor en macrófagos activados con LPS. En la regulación de la expresión de Egr-1 se ha demostrado la participación de MAPK (quinasas activadas por mitógenos), además de factores de transcripción como NFκB (Deckmann, K., *et al.*, 2012; Guha, M., *et al.*, 2001; Harja, E., *et al.*, 2004; Hoffmann, E., *et al.*, 2008). Recientemente se ha identificado un mecanismo de regulación positiva de Egr-1 sobre su propio promotor (Wang, B., *et al.*, 2010). De tal forma, quedaría por determinar si la inhibición de la expresión de Egr-1 mediada por LXR/RXR se produciría de forma directa sobre el propio factor, o de forma indirecta, como consecuencia de los efectos inhibidores de estos receptores sobre factores implicados en la inducción de su expresión, tales como NFκB.

Egr-1 participa en la regulación de la expresión de multitud de genes que participan en diversos procesos patológicos con carácter inflamatorio (Harja, E., *et al.*, 2004; Khachigian, L.M., 2006; McCaffrey, T.A., *et al.*, 2000). De tal manera, la interferencia con la inducción de Egr-1 contribuiría a las acciones anti-inflamatorias de los LXRs, a través de la regulación de la expresión de genes dependientes de este factor en macrófagos activados incluyendo COX-2 y mPGES-1, además de otros como MCP-1, TNFα, IL-1β o el factor tisular (TF) (Deckmann, K., *et al.*, 2010; Khachigian, L.M., 2006; McCaffrey, T.A., *et al.*, 2000; Ninomiya, Y., *et al.*, 2007; Terasaka, N., *et al.*, 2005).

En resumen, estos resultados indicarían que los ligandos de LXR, junto con ligandos de RXR, ejercerían sus efectos sobre la vía de señalización estudiada a diferentes niveles, inhibiendo la expresión de las enzimas COX-2 y mPGES-1 por interferencia con los factores de transcripción NFκB y Egr-1, y produciendo por tanto una reducción en la producción de PGE<sub>2</sub> por parte de los macrófagos activados con LPS.

## **2.- Efectos de los ligandos de receptores RXR sobre la expresión génica en macrófagos**

### **2.1. Represión de la expresión de COX-2 y mPGES-1 inducidas por LPS**

Como se ha puesto de manifiesto en el apartado anterior, existe un efecto cooperativo entre los ligandos de LXR y el ligando de RXR 9cisRA (ácido 9-cis retinoico)

en cuanto a la activación de elementos de respuesta a LXR en el ADN (LXRE). Este efecto conjunto de ambos tipos de ligandos también ocurre en cuanto a la represión de la expresión de genes inflamatorios, como en el caso de la inhibición de la inducción de COX-2 en macrófagos estimulados con LPS, de tal manera que el efecto inhibitor sobre la expresión de esta enzima se produce de forma más pronunciada en los tratamientos combinados de ligandos de LXR y 9cisRA. Por otra parte, observamos que el tratamiento con ligandos de RXR per sé, es capaz de ejercer efectos tanto inductores sobre elementos de respuesta LXRE, como inhibidores sobre la expresión de genes, de forma similar a los observado con los ligandos de LXR.

Cabe destacar que el ligando 9cisRA, además de poder señalar a través de su unión con heterodímeros LXR/RXR, también puede ejercer su acción reguladora a través de otros receptores que forman heterodímeros permisivos con RXR como por ejemplo PPAR/RXR o favorecer la activación de elementos de respuesta a RXR en el ADN (RXRE) a través de homodímeros RXR/RXR. También se ha descrito que este metabolito de la vitamina A es capaz de activar receptores RAR (receptores de ácido retinoico) (Bishop-Bailey, D., 2000; Egea, P.F., *et al.*, 2000; Ijpenberg, A., *et al.*, 2004; Moraes, L.A., *et al.*, 2006). Con el fin de definir acciones propias a través de receptores RXR, se ha usado el ligando de RXR SR11237, que señala preferentemente a través de receptores RXR, pudiendo activar diferentes heterodímeros RXR/NR (receptor nuclear) siempre que sean permisivos, pero sin afectar la actividad de otros como RAR/RXR (Pérez, E., *et al.*, 2012). De acuerdo con esto, comprobamos que, mientras que el tratamiento de macrófagos con 9cisRA promueve la inducción de la activación transcripcional tanto de la construcción RXRE-luc como la de RARE-luc, el tratamiento con SR11237 sólo afecta la inducción de la expresión génica dependiente de elementos RXRE, sin alterar aquella mediada por elementos RARE.

En cuanto a la capacidad señalizadora del ligando de RAR utilizado en este estudio, ATRA (ácido *all-trans* retinoico), además de activar los RARE, se ha descrito que puede metabolizarse generando 9cisRA, activando de esta forma, aunque en menor medida, elementos RXRE (Dilworth, F.J., *et al.*, 1999; Heyman, R.A., *et al.*, 1992; Lefebvre, P., *et al.*, 2010; Mangelsdorf, D.J., *et al.*, 1992). En concordancia con esto, observamos que la inducción de la actividad luciferasa dependiente de RXRE también se produce en células tratadas con ATRA, aunque de forma más moderada que aquella dependiente de RARE. Estudios adicionales bien con ligandos específicos agonistas o antagonistas, bien con el uso de células carentes de uno u otro de los potenciales receptores implicados, así como con el análisis de formas mutantes de los mismos, servirían para conocer con mayor precisión la participación de cada uno de estos

receptores en los efectos sobre la trans-represión de genes observada (Ayaori, M., *et al.*, 2012).

Atendiendo al efecto de los ligandos de RXR, y de forma similar a lo observado con los ligandos de LXR, los resultados obtenidos muestran la interferencia de la activación de RXR con los factores de transcripción NFκB y Egr-1. Estas evidencias coinciden parcialmente con otras previas, como por ejemplo el estudio llevado a cabo por Austenaa L.M. *et al.* (Austenaa, L.M., *et al.*, 2009) en el que se describe la inhibición de la actividad de NFκB por efectos de ligandos RXR/RAR, aunque, en contraposición a lo observado en nuestro modelo experimental, en el sistema empleado por este grupo de investigación los ligandos específicos de RXR como el SR11237 no tienen efectos sobre este factor de transcripción. En lo que se refiere a la participación de los ligandos de RXR sobre la inducción de Egr-1, como se describe en el apartado anterior de esta discusión, no existen evidencias previas al respecto.

Los estudios acerca de los efectos de ligandos de RXR y RAR en el desarrollo de procesos inflamatorios en diferentes tipos celulares y diversos contextos experimentales, muestran efectos contrarios en muchos casos, ya que se han descrito tanto propiedades anti-inflamatorias (Austenaa, L.M., *et al.*, 2009; Kim, B.-H., *et al.*, 2004; Zhou, L., *et al.*, 2010), como efectos de inducción sobre la expresión de mediadores inflamatorios (Alique, M., *et al.*, 2007; Kim, B., *et al.*, 2008; Tsukamoto, H., *et al.*, 2004) para estos metabolitos de la vitamina A. La controversia aparente entre los resultados obtenidos por unos grupos de investigación y otros puede deberse principalmente al modelo experimental utilizado ya que diferentes factores célula-específicos como son la abundancia de los receptores o de determinadas isoformas y la disponibilidad de moléculas co-reguladoras (Han, K., *et al.*, 2011; Lammi, J., *et al.*, 2008; Lefebvre, P., *et al.*, 2010), o el estado de diferenciación/activación celular (Kim, B., *et al.*, 2008; Tsukamoto, H., *et al.*, 2004), pueden determinar el carácter pro o anti-inflamatorio del ácido retinoico en cada caso.

## **2.2. Inducción de la expresión de la ciclooxygenasa-1**

En este trabajo describimos un potente efecto inductor de los ligandos de receptores RXR sobre la expresión de COX-1 en macrófagos, a dosis bajas, y en ausencia de tratamiento con LPS. De forma similar, el ácido *all-trans* retinoico (ATRA) también produce un aumento de COX-1 en estas células, quedando abierta la cuestión de las posibilidades de señalización por los diferentes receptores nucleares implicados, como se discute en el apartado anterior, aunque excluyéndose en este caso la participación de los LXRs ya que los ligandos de estos receptores nucleares no tienen ningún efecto apreciable sobre la expresión de esta ciclooxygenasa.

La visión clásica en cuanto a la regulación de la expresión de las dos isoformas de ciclooxigenasas considera a COX-1 como la enzima constitutivamente expresada y a COX-2 como la isoforma inducible por diferentes estímulos. Sin embargo, algunos trabajos han descrito la inducción de la expresión de COX-1 en algunos sistemas, atribuyéndole un carácter inducible en determinadas condiciones (Gibson, L.L., *et al.*, 2005; Smith, C.J., *et al.*, 1993; Sun, H., *et al.*, 2008; Taniura, S., *et al.*, 2002). De hecho, en relación con nuestros resultados, se ha descrito un aumento de COX-1 por efecto del tratamiento con ácido retinoico en otros sistemas experimentales (Jiang, Y.J., *et al.*, 2003; Schneider, N., *et al.*, 2001).

El aumento de ARNm y de proteína de COX-1 se traduce en un incremento en la concentración de PGE<sub>2</sub> en los sobrenadantes de cultivo de las células tratadas con ligandos de RXR, si bien no se alcanzan los valores de producción de PGE<sub>2</sub> tras el aumento de COX-2 en respuesta a LPS, en lo que influiría el hecho de que la expresión basal de la sintasa mPGES-1 no se ve alterada por el tratamiento con ligandos de RXR. La PGE<sub>2</sub> tiene gran relevancia en cuanto a sus efectos sobre la respuesta inmune e inflamatoria, asociándose su producción en mayor medida a la actividad de COX-2 respecto a la de la COX-1, y en respuesta a estímulos pro-inflamatorios (Cipollone, F., *et al.*, 2005; Linton, M.F. and Fazio, S., 2004; Matsumoto, H., *et al.*, 1997). La actividad de COX-1 se ha asociado principalmente al incremento de otros prostanoides como el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (McClelland, S., *et al.*, 2009). En nuestro caso, no hemos podido determinar de forma precisa los cambios en la producción de tromboxano tras el tratamiento con ligandos de RXR, por lo que permanecerían por investigar los efectos sobre el balance final de prostanoides que puede tener la inducción de COX-1 en nuestro modelo experimental. De esta forma, y a pesar de que otros estudios coinciden con los resultados que se muestran en este trabajo indicando una relación entre la producción basal de PGE<sub>2</sub> y la actividad de COX-1 (Jiang, Y.J., *et al.*, 2003; Niknami, M., *et al.*, 2010), no podemos descartar que los tratamientos realizados con ligandos de RXR produzcan efectos adicionales sobre la producción de otros eicosanoides.

La caracterización del efecto inductor de ligandos de RXR sobre la COX-1, si bien se puede observar a tiempos cortos tras el tratamiento, nos indica que se requiere de la síntesis *de novo* de proteínas, lo que descartaría un efecto directo del receptor RXR activado sobre el promotor de COX-1. Estudios recientes han definido cómo la activación de receptores RXR, de forma selectiva e independiente de otros receptores nucleares asociados, puede regular la activación transcripcional de genes en macrófagos, como las quimioquinas CCL6 y CCL9 (Núñez, V., *et al.*, 2010), sugiriendo que RXR puede ser un importante mediador inflamatorio en macrófagos durante la respuesta inmune innata. El

hecho de que el efecto de los RXR sobre la COX-1 sea indirecto, sugiere la regulación por estos receptores nucleares de factores esenciales en la regulación de la expresión de esta enzima. Entre estos factores destaca SP-1, con un papel esencial en la transcripción de COX-1 en varios modelos celulares (DeLong, C.J. and Smith, W.L., 2005; Taniura, S., *et al.*, 2002; Xu, X.-M., *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos descartarían, en principio su participación en tanto en cuanto la activación de RXR no influye en la inducción de la expresión de su ARNm en macrófagos, aunque queda pendiente de análisis la posible influencia de los ligandos sobre la modulación de las propiedades de SP-1 como activador transcripcional.

La identificación de la inducción de COX-1 en este sistema como un mecanismo indirecto podría explicar las diferencias observadas en cuanto a los diferentes tipos de macrófagos analizados. Mientras que el aumento de COX-1 mediado por activación de RXR se observa en líneas celulares y cultivos primarios que expresan niveles bajos de esta enzima en estado basal, como pueden ser las células THP-1, RAW264.7 y los macrófagos derivados de médula ósea (BMDM), la incubación con los ligandos en células en las que la expresión basal de COX-1 es elevada, como en el caso de los macrófagos peritoneales de ratón, el tratamiento con ligandos de RXR no produce efectos apreciables. Esta aparente discrepancia en los resultados obtenidos podría deberse a la diversa disponibilidad o actividad de las proteínas intermediarias implicadas, aún sin identificar, en los diferentes sistemas celulares.

Por otra parte, el hecho de que en ciertos tipos de macrófagos no se observen estos efectos podría explicarse por los efectos del ácido retinoico sobre la diferenciación de macrófagos. De tal manera, las acciones inductoras de la transcripción de genes como la COX-1, por parte de los metabolitos de la vitamina A, estarían asociadas a su capacidad para estimular la diferenciación celular (Chen, Q. and Ross, A.C., 2004; Jiang, Y.J., *et al.*, 2003). En este sentido, sería interesante estudiar la posibilidad de que las diferencias entre la inducibilidad de la COX-1 en BMDM y en macrófagos peritoneales se deban a diferencias en la maduración, estado de activación o polarización de las células estudiadas mediadas por la activación de receptores RXR. Apoyando esta idea, publicaciones previas así como datos no presentados de nuestro grupo de investigación, muestran que podría existir una relación entre la expresión de arginasa I, enzima que se asocia a macrófagos de tipo M2 (Cassetta, L., *et al.*, 2011; Gordon, S., 2003; Porta, C., *et al.*, 2009), y la activación de receptores LXR/RXR. Además del incremento de arginasa II mediado por los LXRs (Marathe, C., *et al.*, 2006), se ha descrito que los ligandos de RXR (Gallardo-Soler, A., *et al.*, 2008) así como la activación de los LXRs (Pourcet, B., *et al.*, 2011), pueden inducir o favorecer la expresión de arginasa I. Estos resultados animan al



análisis detallado de la expresión de diversos marcadores de macrófagos, no sólo de diferenciación, sino también de maduración o polarización, en células incubadas con los ligandos de RXR. Estos estudios contribuirían a comprender con mayor precisión los mecanismos responsables de la regulación transcripcional de genes como la COX-1 tras la activación de RXR además de entender su significado a nivel fisiopatológico.

### 3.- Acciones de ligandos de LXR sobre la migración de macrófagos

Las acciones de los ligandos de LXR y RXR sobre la regulación de la expresión de genes inflamatorios en macrófagos activados tienen como consecuencia una alteración en la funcionalidad de los mismos y en el desarrollo de la respuesta inmune innata. Así, diversos trabajos han confirmado el papel anti-inflamatorio de los receptores LXR *in vivo* (Fowler, A.J., *et al.*, 2003; Li, N., *et al.*, 2010; Morales, J.R., *et al.*, 2008). La activación de los LXRs promueve la supervivencia de los macrófagos en el contexto de una infección, jugando un papel esencial en la inducción de fagocitosis de células apoptóticas por parte de los macrófagos (A-Gonzalez, N., *et al.*, 2009; Joseph, S.B., *et al.*, 2004).

La migración de células inmunes es otro de los componentes determinantes en el desarrollo y resolución de procesos inflamatorios (Kim, H.S., *et al.*, 2012). En este sentido, en esta tesis doctoral se describe como la activación de estos receptores nucleares reduce la migración de la línea celular de macrófagos RAW264.7. La interferencia con la migración de células inmunes por parte de los receptores LXR se ha estudiado en menor medida respecto a los efectos anti-inflamatorios asociados a represión de genes que codifican para mediadores inflamatorios. Aun así, existen evidencias en este sentido que apuntan hacia una implicación de estos receptores nucleares en la migración de células dendríticas (Bruckner, M., *et al.*, 2012; Feig, J.E., *et al.*, 2010), linfocitos (Walcher, D., *et al.*, 2010), y neutrófilos (Smoak, K., *et al.*, 2008).

Las células RAW264.7 responden tanto a estímulos quimiotácticos como MCP-1 o gradiente de FCS, como a un estímulo de características quimioquinéticas como el LPS, induciendo su migración (Tajima, T., *et al.*, 2008). En todos los casos se observa una reducción en este proceso tras la activación de receptores LXR, lo que podría indicar que la interferencia con la migración de macrófagos se produce a un nivel de la ruta de señalización que es común en todos los estímulos utilizados, o a diferentes niveles dependiendo de la cascada de señalización que se induce. En este aspecto, y de cara a conocer con mayor precisión los efectos de los ligandos de LXR sobre la migración de macrófagos existen diversas posibilidades a tener en cuenta.

En primer lugar, los defectos en la migración de células tratadas con TO901317 podrían deberse a la modificación de los receptores de quimioquinas implicados, ya sea a nivel de su expresión o a nivel de su actividad. Los estudios previos realizados en este sentido se centran principalmente en la regulación mediada por LXR del receptor CCR7, que está implicado en la migración de células dendríticas hacia los nódulos linfáticos. Existe controversia en cuanto a los efectos de los ligandos de LXR sobre este receptor de quimioquinas, ya que se han descrito tanto acciones de inhibición que llevan a una menor migración de las células (Bruckner, M., *et al.*, 2012), como acciones de inducción de su expresión que favorecen una mayor movilización celular (Feig, J.E., *et al.*, 2010). Estas diferencias o contradicciones aparentes podrían deberse a los diferentes contextos en los que se desarrollan los diversos estudios y a la diferencia entre el estado de maduración de las células empleadas en cada caso. En lo que se refiere a la migración de macrófagos, y por tanto al desarrollo e interpretación de los resultados mostrados en este trabajo, sería de mayor relevancia estudiar los efectos de los ligandos de LXR sobre otros receptores de quimioquinas que regulan específicamente la migración de este tipo celular hacia el foco inflamatorio como es el caso del receptor de MCP-1 (CCR2) (Deshmane, S.L., *et al.*, 2009; Zhang, J., *et al.*, 2010). Tras la activación de macrófagos se produce un incremento en la producción de quimioquinas como MCP-1, sobre cuya expresión hemos visto que interferirían los LXRs, hecho que también participaría en las alteraciones de la capacidad migratoria de macrófagos.

Por otra parte, es posible que la reducción en la migración de macrófagos mediada por receptores LXR se produzca como consecuencia de los efectos de estos receptores nucleares sobre las moléculas implicadas en la vía de señalización que se desencadena tras la unión de la quimioquina al receptor o del estímulo inicial, como son las MAPK (quinasas activadas por mitógeno) (Kim, H.S., *et al.*, 2012). A la vista de los resultados obtenidos, al menos el incremento de la fosforilación de la quinasa ERK que se produce en respuesta a estos estímulos, no se vería afectada por los tratamientos con TO901317 en macrófagos. Esta observación coincide con los mecanismos descritos para otro receptor nuclear como es PPAR $\gamma$ , que inhibe la migración de células endoteliales sin afectar la actividad de ésta u otras MAPK (Goetze, S., *et al.*, 2002). Por el contrario, existen evidencias que relacionan los efectos de los LXRs sobre la migración de linfocitos con la disminución en la actividad de otra quinasa como es PI3K (fosfatidilinositol-3 quinasa) (Walcher, D., *et al.*, 2010).

Otra posibilidad a tener en cuenta en el estudio de los efectos sobre la migración de macrófagos por receptores LXR sería la de que la menor migración de macrófagos activados ocurriera como consecuencia de la disminución en la producción de PGE<sub>2</sub> que



ocurre en respuesta al tratamiento con ligandos de LXR. La relación entre esta prostaglandina y la inducción de procesos migratorios se ha descrito ampliamente en la literatura (Bruckner, M., *et al.*, 2012; Côté, S.C., *et al.*, 2009; Panzer, U. and Uguccioni, M., 2004; Tajima, T., *et al.*, 2008; Yen, J.-H., *et al.*, 2008). En este sentido sería interesante investigar si la reducción en la migración de macrófagos tratados con ligandos de LXR se revierte mediante la adición exógena de PGE<sub>2</sub>, o mediante la sobre-expresión de alguna de las enzimas implicadas en su síntesis. De esta forma, se aportarían nuevos datos en cuanto a la regulación de la migración de macrófagos, pero también en cuanto a los diversos mecanismos mediante los cuales pueden ejercer acciones anti-inflamatorias los receptores nucleares LXR.

#### **4.- Efectos de los ligandos de receptores LXR sobre el desarrollo de lesiones aórticas en un modelo murino de AAA**

La investigación de las acciones de los ligandos de diversos receptores nucleares como LXR, RXR o PPAR, sobre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares ha adquirido una gran relevancia en los últimos años, habiéndose realizado diversos estudios en este sentido, con el uso de modelos animales (Claudel, T., *et al.*, 2001; Levin, N., *et al.*, 2005). En particular, existe amplia bibliografía en referencia a los efectos de la activación de receptores LXR *in vivo* sobre el desarrollo de aterosclerosis (Hu, B., *et al.*, 2010; Joseph, S.B., *et al.*, 2002b; Kratzer, A., *et al.*, 2009; Peng, D., *et al.*, 2008; Terasaka, N., *et al.*, 2003).

En esta tesis doctoral se muestra el análisis de los efectos del ligando sintético de LXR TO901317, sobre un modelo animal de AAA previamente descrito que consiste en la infusión continuada de angiotensina II en ratones ApoE<sup>-/-</sup> (Cao, R.Y., *et al.*, 2010; Daugherty, A., *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos tanto a nivel de los estudios histológicos de las aortas, como a nivel de la regulación de la expresión génica en las lesiones de AAA, indican que la activación de los receptores LXR en este modelo podría reducir la severidad o progresión de las lesiones aórticas propias de esta enfermedad. Los efectos mediados por el ligando de los LXRs pueden deberse a su acción sobre diferentes factores implicados en el desarrollo de la patología.

En primer lugar, la reducción en la incidencia y grado de aneurismas que se observa en el grupo de tratamiento con TO901317 puede deberse al papel que juegan estos receptores nucleares en la regulación del metabolismo del colesterol. En este sentido, de acuerdo con los datos obtenidos en cuanto a la expresión de ABCA1 en los tejidos de ratones tratados con TO901317, existen evidencias previas que muestran que

el tratamiento con ligandos de LXR produce un aumento en la expresión de transportadores de colesterol implicados en el transporte reverso del mismo y una disminución de su acumulación excesiva (Joseph, S.B., *et al.*, 2002b; Peng, D., *et al.*, 2008; Terasaka, N., *et al.*, 2003; Yasuda, T., *et al.*, 2010).

Por otra parte, los efectos observados en ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II y tratados con el ligando de los LXRs, pueden deberse a las acciones anti-inflamatorias de estos receptores nucleares (Im, S.-S. and Osborne, T.F., 2011; Rigamonti, E., *et al.*, 2008). En este trabajo se muestran evidencias obtenidas mediante ensayos *in vitro* que indican que los ligandos de LXR interfieren con la expresión de mediadores inflamatorios y con los procesos de migración de macrófagos. Además, los datos obtenidos en los estudios *in vivo* también ponen de manifiesto una reducción en la expresión de genes pro-inflamatorios en las lesiones aórticas de los ratones del grupo de tratamiento con TO901317, apoyando la idea de que los efectos observados en cuanto a la disminución en la incidencia de AAA por activación de los LXRs en este modelo, pueden ser en parte reflejo de una reducción en el componente inflamatorio de la patología. Así mismo, en concordancia con los resultados obtenidos en cuanto a la influencia de los ligandos de LXR sobre la migración de macrófagos, en los animales tratados con el ligando TO901317 se observa una disminución de la inducción de la quimioquina MCP-1 y del marcador de macrófagos tisulares CD68, observándose a su vez una disminución en el infiltrado inflamatorio celular en las lesiones de AAA de este grupo de animales.

Por último, el tratamiento con el ligando de LXR podría afectar también al desarrollo de AAA a través de sus acciones sobre la expresión de enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular, lo que constituye otra de las características de la patología. A falta de abordar un estudio detallado de las lesiones de AAA en este sentido, el análisis histológico pone de manifiesto por ejemplo una reducción en la degradación de la lámina elástica en el grupo tratado con el ligando de LXR. Publicaciones previas han descrito los efectos inhibidores de los LXRs sobre proteínas implicadas en degradación de matriz, como la metaloproteinasa-9 (MMP-9) *in vitro* (Castrillo, A., *et al.*, 2003).

En general, para la interpretación de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo, cabe tener en cuenta las limitaciones de los estudios *in vivo* que se presentan en esta tesis doctoral. El mayor obstáculo de cara a la obtención de conclusiones estadísticamente significativas ha sido la disponibilidad de un reducido número de animales por grupo. Además, la realización del análisis de las lesiones únicamente bajo unas condiciones temporales y de dosis de los tratamientos concretas, dificulta la

comprensión global de los efectos de TO901317 a lo largo del desarrollo de la enfermedad. En este sentido, sería importante observar de forma continuada la progresión de las lesiones y los efectos del tratamiento en las diversas etapas de formación de aneurismas. De esta forma, la expresión de algunos de los genes analizados en este trabajo podría verse modificada en mayor o menor medida en fases iniciales o tardías de la patología, aportando datos de gran relevancia para nuestro estudio.

Otra de las consideraciones importantes en cuanto al análisis de los efectos del TO901317 sobre el AAA, es el hecho de que el desarrollo de las lesiones implica la participación de multitud de tipos celulares, incluyendo tanto células del sistema inmune como macrófagos o linfocitos, como células vasculares de músculo liso, fibroblastos, y células endoteliales (Annambhotla, S., *et al.*, 2008; Lindholt, J.S. and Shi, G.P., 2006). Si bien esta tesis doctoral se ha centrado en los efectos de la activación de receptores LXR en macrófagos, no se debe descartar la posible aportación de cada uno de los tipos celulares implicados en cuanto a los efectos del tratamiento sistémico con ligandos de los LXRs en el modelo animal de AAA. En general, los receptores LXR podrían estar participando en la regulación de gran parte de los principales factores involucrados en la progresión del AAA, como son la regulación del metabolismo del colesterol, la acumulación de macrófagos y células inmunes en las lesiones, la elevada expresión de mediadores inflamatorios, o la degradación de la matriz extracelular (Aoki, H., *et al.*, 2007; Miyake, T. and Morishita, R., 2009). De tal forma, nuestras observaciones apoyarían un estudio completo de los efectos de los ligandos de los LXRs sobre el desarrollo de AAA, que podría aportar información de gran relevancia en cuanto al conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y sobre la potencial actividad terapéutica de estos ligandos.

Los avances realizados en el área de desarrollo de fármacos o ligandos de LXR específicos de isoforma o de tejido, abren nuevas posibilidades de investigación, reduciendo los efectos negativos de este tipo de tratamientos (Fiévet, C. and Staels, B., 2009; Jakobsson, T., *et al.*, 2012; Joseph, S.B., *et al.*, 2002a; Schultz, J.R., *et al.*, 2000). En general, una de las estrategias más utilizadas ha sido la de evitar la hiperlipidemia que ocurre tras la administración in vivo de ligandos “clásicos” o agonistas plenos de LXR, mediante la activación específica de receptores LXR $\beta$ , que intervienen en menor medida en la regulación de la lipogénesis hepática respecto a la isoforma  $\alpha$  (Bischoff, E.D., *et al.*, 2010; Bradley, M.N., *et al.*, 2007; Hong, C., *et al.*, 2012; Quinet, E.M., *et al.*, 2006). Además de ligandos específicos de isoforma, también se han desarrollado ligandos que ejercen sus efectos en un tejido determinado, evitando por ejemplo la activación de los

LXR en el hígado y el consiguiente aumento de lípidos (Hu, B., *et al.*, 2010; Kratzer, A., *et al.*, 2009; Peng, D., *et al.*, 2011; Yan, W., *et al.*, 2010; Yasuda, T., *et al.*, 2010).

En conclusión, los resultados que se muestran en esta tesis doctoral al respecto de los efectos de la activación de receptores LXR *in vivo*, suponen una base de partida de cara a posteriores estudios y una estrategia de gran interés en el área de investigación de determinadas enfermedades cardiovasculares como es el AAA.

## ***CONCLUSIONES***

---



Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral nos permiten concluir que la expresión tanto de la COX-2, como de la mPGES-1, inducidas por el tratamiento de macrófagos con LPS, se ve reducida por efecto de la activación de receptores LXR/RXR en respuesta al tratamiento con ligandos específicos. Esto produce a su vez una disminución en la producción de PGE<sub>2</sub> por parte de las células incubadas con ligandos de LXR previamente a su estimulación con LPS. El mecanismo de acción a través del cual se produce esta reducción en la expresión génica en macrófagos activados con LPS, implica la interferencia de la activación de receptores LXR y RXR con la actividad de los factores de transcripción NFκB y Egr-1.

Por otra parte, en este estudio se define un efecto inductor de los ligandos de receptores RXR y RAR, pero no de los ligandos de LXR, sobre la expresión basal de la COX-1 en líneas celulares tipo monocito/macrófago, así como en macrófagos derivados de médula ósea, si bien esta inducción no tiene lugar en macrófagos peritoneales obtenidos tras el tratamiento con tioglicolato. El aumento en la expresión de COX-1 mediado por la activación de receptores RXR y RAR sería indirecto, requiriendo de la síntesis *de novo* de proteínas intermediarias.

Otra serie de evidencias presentadas en este trabajo ponen de manifiesto la asociación entre la activación de receptores LXR y una disminución en la migración de células RAW264.7 en respuesta a estímulos como el LPS, el suero y la quimioquina MCP-1.

Finalmente, las evidencias obtenidas tras el análisis de los efectos del tratamiento con el ligando de LXR TO901317 sobre el desarrollo de lesiones de aneurisma aórtico abdominal en ratones ApoE<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina II, muestran una posible implicación de los receptores LXR en el desarrollo de estas lesiones. De tal forma, en el grupo de ratones tratados con TO901317, se observa una menor incidencia y progresión en la formación de lesiones de aneurisma.





## ***BIBLIOGRAFÍA***

---



**A-Gonzalez, N.; Bensinger, S.J.; Hong, C.; Beceiro, S.; Bradley, M.N.; Zelcer, N.; Deniz, J.; Ramirez, C.; Díaz, M.; Gallardo, G.; Ruiz de Galarreta, C.; Salazar, J.; Lopez, F.; Edwards, P.; Parks, J.; Andujar, M.; Tontonoz, P. and Castrillo, A. (2009).** Apoptotic Cells Promote Their Own Clearance and Immune Tolerance through Activation of the Nuclear Receptor LXR. *Immunity* 31, 245-258

**Albers, M.; Blume, B.; Schlueter, T.; Wright, M.B.; Kober, I.; Kremoser, C.; Deuschle, U. and Koegl, M. (2006).** A Novel Principle for Partial Agonism of Liver X Receptor Ligands: Competitive recruitment of activators and repressors. *Journal of Biological Chemistry* 281, 4920-4930

**Alfranca, A.; Iñiguez, M.A.; Fresno, M. and Redondo, J.M. (2006).** Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: Role in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* 70, 446-456

**Alique, M.; Herrero, J. and Lucio-Cazana, F. (2007).** All-trans retinoic acid induces COX-2 and prostaglandin E2 synthesis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: involvement of retinoic acid receptors and extracellular-regulated kinase 1/2. *Journal of Neuroinflammation* 4, 1

**Annambhotla, S.; Bourgeois, S.; Wang, X.; Lin, P.H.; Yao, Q. and Chen, C. (2008).** Recent Advances in Molecular Mechanisms of Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *World Journal of Surgery* 32, 976-986

**Aoki, H.; Yoshimura, K. and Matsuzaki, M. (2007).** Turning back the clock: regression of abdominal aortic aneurysms via pharmacotherapy. *Journal of Molecular Medicine* 85, 1077-1088

**Apfel, R.; Benbrook, D.; Lernhardt, E.; Ortiz, M.A.; Salbert, G. and Magnus, P. (1994).** A novel Orphan Receptor Specific for a Subset of Thyroid Hormone-Responsive Elements and its Interaction with the Retinoid/Thyroid Hormone Receptor Subfamily. *Molecular and Cellular Biology* 14, 7025-7035

**Arenzana-Seisdedos, F.; Fernandez, B.; Dominguez, I.; Jacqué, J.M.; Thomas, D.; Diaz-Meco, M.T.; Moscat, J. and Virelizier, J.L. (1993).** Phosphatidylcholine hydrolysis activates NF-kappa B and increases human immunodeficiency virus replication in human monocytes and T lymphocytes. *Journal of Virology* 67, 6596-6604

**Austena, L.M.; Carlsen, H.; Hollung, K.; Blomhoff, H.K. and Blomhoff, R. (2009).** Retinoic acid dampens LPS-induced NF-kB activity: results from human monoblasts and in vivo imaging of NF-kB reporter mice. *The Journal of nutritional biochemistry* 20, 726-734

**Ayaori, M.; Yakushiji, E.; Ogura, M.; Nakaya, K.; Hisada, T.; Uto-Kondo, H.; Takiguchi, S.; Terao, Y.; Sasaki, M.; Komatsu, T.; Iizuka, M.; Yogo, M.; Uehara, Y.; Kagechika, H.; Nakanishi, T. and Ikewaki, K. (2012).** Retinoic acid receptor agonists regulate expression of ATP-binding cassette transporter G1 in macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821, 561-572

**Baranowski, M. (2008).** Biological Role of Liver X Receptors. *Journal of Physiology and Pharmacology* 59, 31-55

**Barish, G.D.; Downes, M.; Alaynick, W.A.; Yu, R.T.; Ocampo, C.B.; Bookout, A.L.; Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M. (2005).** A Nuclear Receptor Atlas: Macrophage Activation. *Molecular Endocrinology* 19, 2466-2477

**Bartoli, M.A.; Parodi, F.E.; Chu, J.; Pagano, M.B.; Mao, D.; Baxter, B.T.; Buckley, C.; Ennis, T.L. and Thompson, R.W. (2006).** Localized administration of doxycycline suppresses aortic dilatation in an experimental mouse model of abdominal aortic aneurysm. *Annals of Vascular Surgery* 20, 228-236

**Bischoff, E.D.; Daige, C.L.; Petrowski, M.; Dedman, H.; Pattison, J.; Juliano, J.; Li, A.C. and Schulman, I.G. (2010).** Non-redundant roles for LXRA and LXRβ in atherosclerosis susceptibility in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Journal of Lipid Research* 51, 900-906

**Bishop-Bailey, D. (2000).** Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology* 129, 823-834

**Bode, J.G.; Ehling, C. and Häussinger, D. (2012).** The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK-STAT3 axis. *Cellular Signalling* 24, 1185-1194

**Bradley, M.N.; Hong, C.; Chen, M.; Joseph, S.B.; Wilpitz, D.C.; Wang, X.; Lusis, A.J.; Collins, A.; Hseuh, W.A.; Collins, J.L.; Tangirala, R.K. and Tontonoz, P. (2007).** Ligand activation of LXR β reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking LXR α and apoE. *The Journal of Clinical Investigation* 117, 2337-2346

**Brélivet, Y.; Rochel, N. and Moras, D. (2012).** Structural analysis of nuclear receptors: From isolated domains to integral proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology* 348, 466-473

**Bruckner, M.; Dickel, D.; Singer, E. and Legler, D.F. (2012).** Converse regulation of CCR7-driven human dendritic cell migration by prostaglandin E2 and liver X receptor activation. *European Journal of Immunology* 42, 2949-2958

**Calkin, A.C. and Tontonoz, P. (2012).** Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13, 213-224

**Cao, R.Y.; Adams, M.A.; Habenicht, A.J. and Funk, C.D. (2007).** Angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm occurs independently of the 5-lipoxygenase pathway in apolipoprotein E-deficient mice. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 84, 34-42

**Cao, R.Y.; St. Amand, T.; Ford, M.D.; Piomelli, U. and Funk, C.D. (2010).** The murine angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm model: rupture risk and inflammatory progression patterns. *Frontiers in Pharmacology* 1,

**Carmody, R.J. and Chen, Y.H. (2007).** Nuclear factor-κB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cellular and Molecular Immunology* 4, 31-34

**Cassetta, L.; Cassol, E. and Poli, G. (2011).** Macrophage Polarization in Health and Disease. *The Scientific World Journal* 11, 12

**Castrillo, A.; Joseph, S.B.; Marathe, C.; Mangelsdorf, D.J. and Tontonoz, P. (2003).** Liver X Receptor-dependent Repression of Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 278, 10443-10449

**Castrillo, A. and Tontonoz, P. (2004).** Nuclear receptors in macrophage biology: At the Crossroads of Lipid Metabolism and Inflammation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 455-480

**Chao, E.Y.; Caravella, J.A.; Watson, M.A.; Campobasso, N.; Ghisletti, S.; Billin, A.N.; Galardi, C.; Wang, P.; Laffitte, B.A.; Iannone, M.A.; Goodwin, B.J.; Nichols, J.A.; Parks, D.J.; Stewart, E.; Wiethe, R.W.; Williams, S.P.; Smallwood, A.; Pearce, K.H.; Glass, C.K.; Willson, T.M.; Zuercher, W.J. and Collins, J.L. (2008).** Structure-Guided Design of N-Phenyl Tertiary Amines as Transrepression-Selective Liver X Receptor Modulators with Anti-Inflammatory Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 5758-5765

**Chapple, K.S.; Parry, D.J.; McKenzie, S.; MacLennan, K.A.; Jones, P. and Scott, D.J.A. (2007).** Cyclooxygenase-2 Expression and Its Association with Increased Angiogenesis in Human Abdominal Aortic Aneurysms. *Annals of Vascular Surgery* 21, 61-66

- Chen, Q. and Ross, A.C. (2004).** Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells. *Experimental Cell Research* 297, 68-81
- Cheuk, B.L. and Cheng, S.W. (2007).** Differential secretion of prostaglandin E(2), thromboxane A(2) and interleukin-6 in intact and ruptured abdominal aortic aneurysms. *International Journal of Molecular Medicine* 20, 391-395
- Chinetti-Gbaguidi, G. and Staels, B. (2009).** Lipid ligand-activated transcription factors regulating lipid storage and release in human macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791, 486-493
- Cipollone, F.; Fazio, M. and Mezzetti, A. (2005).** Novel determinants of plaque instability. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3, 1962-1975
- Claudel, T.; Leibowitz, M.D.; Fiévet, C.; Tailleux, A.; Wagner, B.; Repa, J.J.; Torpier, G.; Lobaccaro, J.-M.; Paterniti, J.R.; Mangelsdorf, D.J.; Heyman, R.A. and Auwerx, J. (2001).** Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 2610-2615
- Côté, S.C.; Pasvanis, S.; Bounou, S. and Dumais, N. (2009).** CCR7-specific migration to CCL19 and CCL21 is induced by PGE2 stimulation in human monocytes: Involvement of EP2/EP4 receptors activation. *Molecular Immunology* 46, 2682-2693
- Crosby, S.D.; Puetz, J.J.; Simburger, K.S.; Fahrner, T.J. and Milbrandt, J. (1991).** The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Molecular and Cellular Biology* 11, 3835-3841
- Daugherty, A. and Cassis, L.A. (2004).** Mouse Models of Abdominal Aortic Aneurysms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24, 429-434
- Daugherty, A.; Manning, M.W. and Cassis, L.A. (2000).** Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation* 105, 1605-1612
- Daugherty, A.; Rateri, D.L. and Cassis, L.A. (2006).** Role of the Renin-Angiotensin System in the Development of Abdominal Aortic Aneurysms in Animals and Humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1085, 82-91
- de The, H.; Vivanco-Ruiz, M.d.M.; Tiollais, P.; Stunnenberg, H. and Dejean, A. (1990).** Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor & beta; gene. *Nature* 343, 177-180
- Deckmann, K.; Rörsch, F.; Geisslinger, G. and Grösch, S. (2012).** Dimethylcelecoxib induces an inhibitory complex consisting of HDAC1/NF- $\kappa$ B(p65)RelA leading to transcriptional downregulation of mPGES-1 and EGR1. *Cellular Signalling* 24, 460-467
- Deckmann, K.; Rörsch, F.; Steri, R.; Schubert-Zsilavecz, M.; Geisslinger, G. and Grösch, S. (2010).** Dimethylcelecoxib inhibits mPGES-1 promoter activity by influencing EGR1 and NF- $\kappa$ B. *Biochemical Pharmacology* 80, 1365-1372
- DeLong, C.J. and Smith, W.L. (2005).** An intronic enhancer regulates cyclooxygenase-1 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 53-61
- Deshmane, S.L.; Kremlev, S.; Amini, S. and Sawaya, B.E. (2009).** Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 29, 313-326

**Di Gennaro, A.; Wågsäter, D.; Mäyränpää, M.I.; Gabrielsen, A.; Swedenborg, J.; Hamsten, A.; Samuelsson, B.; Eriksson, P. and Haeggström, J.Z. (2010).** Increased expression of leukotriene C4 synthase and predominant formation of cysteinyl-leukotrienes in human abdominal aortic aneurysm. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 21093-21097

**Díaz-Muñoz, M.D.; Osma-García, I.C.; Cacheiro-Llaguno, C.; Fresno, M. and Íñiguez, M.A. (2010).** Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor kappa B and early growth response-1 in macrophages. *Cellular Signalling* 22, 1427-1436

**Dilworth, F.J.; Fromental-Ramain, C.; Remboutsika, E.; Benecke, A. and Chambon, P. (1999).** Ligand-dependent activation of transcription in vitro by retinoic acid receptor alpha/retinoid X receptor alpha heterodimers that mimics transactivation by retinoids in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 1995-2000

**DiRenzo, J.; Söderstrom, M.; Kurokawa, R.; Ogliastro, M.H.; Ricote, M.; Ingrey, S.; Hörlein, A.; Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. (1997).** Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Molecular and Cellular Biology* 17, 2166-2176

**Edwards, P.A.; Kennedy, M.A. and Mak, P.A. (2002).** LXRs: Oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascular Pharmacology* 38, 249-256

**Egea, P.F.; Mitschler, A.; Rochel, N.; Ruff, M.; Chambon, P. and Moras, D. (2000).** Crystal structure of the human RXRalpha ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. *The EMBO Journal* 19, 2592-2601

**Eskandari, M.K.; Vijungco, J.D.; Flores, A.; Borensztajn, J.; Shively, V. and Pearce, W.H. (2005).** Enhanced abdominal aortic aneurysm in TIMP-1-deficient mice. *Journal of Surgical Research* 123, 289-293

**Esteban, V.; Méndez-Barbero, N.; Jiménez-Borreguero, L.J.; Roqué, M.; Novensá, L.; García-Redondo, A.B.; Salaices, M.; Vila, L.; Arbonés, M.L.; Campanero, M.R. and Redondo, J.M. (2011).** Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling. *The Journal of Experimental Medicine* 208, 2125-2139

**Feig, J.E.; Pineda-Torra, I.; Sanson, M.; Bradley, M.N.; Vengrenyuk, Y.; Bogunovic, D.; Gautier, E.L.; Rubinstein, D.; Hong, C.; Liu, J.; Wu, C.; van Rooijen, N.; Bhardwaj, N.; Garabedian, M.J.; Tontonoz, P. and Fisher, E.A. (2010).** LXR promotes the maximal egress of monocyte-derived cells from mouse aortic plaques during atherosclerosis regression. *The Journal of Clinical Investigation* 120, 4415-4424

**Fiévet, C. and Staels, B. (2009).** Liver X receptor modulators: Effects on lipid metabolism and potential use in the treatment of atherosclerosis. *Biochemical Pharmacology* 77, 1316-1327

**Fowler, A.J.; Sheu, M.Y.; Schmuth, M.; Kao, J.; Fluhr, J.W.; Rhein, L.; Collins, J.L.; Willson, T.M.; Mangelsdorf, D.J.; Elias, P.M. and Feingold, K.R. (2003).** Liver X Receptor Activators Display Anti-Inflammatory Activity in Irritant and Allergic Contact Dermatitis Models: Liver-X-Receptor-Specific Inhibition of Inflammation and Primary Cytokine Production. *Journal of Investigative Dermatology* 120, 246-255

**Funk, C.D.; Cao, R.Y.; Zhao, L.E.I. and Habenicht, A.J.R. (2006).** Is There a Role for the Macrophage 5-Lipoxygenase Pathway in Aortic Aneurysm Development in Apolipoprotein E-Deficient Mice? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1085, 151-160

**Gallardo-Soler, A.; Gómez-Nieto, C.; Campo, M.L.; Marathe, C.; Tontonoz, P.; Castrillo, A. and Corraliza, I.s. (2008).** Arginase I Induction by Modified Lipoproteins in Macrophages: A Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma/delta-Mediated Effect that Links Lipid Metabolism and Immunity. *Molecular Endocrinology* 22, 1394-1402

- Ghisletti, S.; Huang, W.; Jepsen, K.; Benner, C.; Hardiman, G.; Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. (2009).** Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes & Development* 23, 681-693
- Ghisletti, S.; Huang, W.; Ogawa, S.; Pascual, G.; Lin, M.-E.; Willson, T.M.; Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. (2007).** Parallel SUMOylation-Dependent Pathways Mediate Gene- and Signal-Specific Transrepression by LXRs and PPARs. *Molecular Cell* 25, 57-70
- Gibson, L.L.; Hahner, L.; Osborne-Lawrence, S.; German, Z.; Wu, K.K.; Chambliss, K.L. and Shaul, P.W. (2005).** Molecular Basis of Estrogen-Induced Cyclooxygenase Type 1 Upregulation in Endothelial Cells. *Circulation Research* 96, 518-525
- Gitlin, J.M.; Trivedi, D.B.; Langenbach, R. and Loftin, C.D. (2007).** Genetic deficiency of cyclooxygenase-2 attenuates abdominal aortic aneurysm formation in mice. *Cardiovascular Research* 73, 227-236
- Goetze, S.; Eilers, F.; Bungenstock, A.; Kintscher, U.; Stawowy, P.; Blaschke, F.; Graf, K.; Law, R.E.; Fleck, E. and Gräfe, M. (2002).** PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293, 1431-1437
- Gordon, S. (2003).** Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35
- Guha, M.; O'Connell, M.A.; Pawlinski, R.; Hollis, A.; McGovern, P.; Yan, S.-F.; Stern, D. and Mackman, N. (2001).** Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 98, 1429-1439
- Han, K.; Moon, I. and Lim, H. (2011).** All-trans- and 9-cis-retinoic acids activate the human cyclooxygenase-2 gene: a role for DR1 as RARE or RXRE. *Molecular Biology Reports* 38, 833-840
- Harja, E.; Bucciarelli, L.G.; Lu, Y.; Stern, D.M.; Zou, Y.S.; Schmidt, A.M. and Yan, S.-F. (2004).** Early Growth Response-1 Promotes Atherogenesis. *Circulation Research* 94, 333-339
- Hayden, M.S.; West, A.P. and Ghosh, S. (2006).** NF- $\kappa$ B and the immune response. *Oncogene* 25, 6758-6780
- Hellenthal, F.A.M.V.I.; Buurman, W.A.; Wodzig, W.K.W.H. and Schurink, G.W.H. (2009a).** Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. *Nature Reviews. Cardiology* 6, 464-474
- Hellenthal, F.A.M.V.I.; Buurman, W.A.; Wodzig, W.K.W.H. and Schurink, G.W.H. (2009b).** Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. *Nature Reviews Cardiology* 6, 543-552
- Heyman, R.A.; Mangelsdorf, D.J.; Dyck, J.A.; Stein, R.B.; Eichele, G.; Evans, R.M. and Thaller, C. (1992).** 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397-406
- Hoffmann, E.; Ashouri, J.; Wolter, S.; Doerrie, A.; Dittrich-Breiholz, O.; Schneider, H.; Wagner, E.F.; Troppmair, J.; Mackman, N. and Kracht, M. (2008).** Transcriptional Regulation of EGR-1 by the Interleukin-1-JNK-MKK7-c-Jun Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 283, 12120-12128
- Hong, C.; Bradley, M.N.; Rong, X.; Wang, X.; Wagner, A.; Grijalva, V.; Castellani, L.W.; Salazar, J.; Realegeno, S.; Boyadjian, R.; Fogelman, A.M.; Van Lenten, B.J.; Reddy, S.T.; Lusis, A.J.; Tangirala, R.K. and Tontonoz, P. (2012).** LXR $\alpha$  is uniquely required for maximal reverse cholesterol transport and atheroprotection in ApoE-deficient mice. *Journal of Lipid Research* 53, 1126-1133



- Hong, C. and Tontonoz, P. (2008).** Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. *Current Opinion in Genetics & Development* 18, 461-467
- Hu, B.; Unwalla, R.J.; Goljer, I.; Jetter, J.W.; Quinet, E.M.; Berrodin, T.J.; Basso, M.D.; Feingold, I.B.; Nilsson, A.G.; Wilhelmsson, A.; Evans, M.J. and Wrobel, J.E. (2010).** Identification of Phenylsulfone-Substituted Quinoxaline (WYE-672) as a Tissue Selective Liver X-receptor (LXR) Agonist. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 3296-3304
- Ijpenberg, A.; Tan, N.S.; Gelman, L.; Kersten, S.; Seydoux, J.; Xu, J.; Metzger, D.; Canaple, L.; Chambon, P.; Wahli, W. and Desvergne, B. (2004).** In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J* 23, 2083-2091
- Im, S.-S. and Osborne, T.F. (2011).** Liver X Receptors in Atherosclerosis and Inflammation. *Circulation Research* 108, 996-1001
- Imayama, I.; Ichiki, T.; Patton, D.; Inanaga, K.; Miyazaki, R.; Ohtsubo, H.; Tian, Q.; Yano, K. and Sunagawa, K. (2008).** Liver X Receptor Activator Downregulates Angiotensin II Type 1 Receptor Expression Through Dephosphorylation of Sp1. *Hypertension* 51, 1631-1636
- Iñiguez, M.A.; Cacheiro-Llaguno, C.; Cuesta, N.; Díaz-Muñoz, M.D. and Fresno, M. (2008).** Prostanoid function and cardiovascular disease. *Archives Of Physiology And Biochemistry* 114, 201-209
- Iñiguez, M.A.; Martínez-Martínez, S.; Punzón, C.; Redondo, J.M. and Fresno, M. (2000).** An Essential Role of the Nuclear Factor of Activated T Cells in the Regulation of the Expression of the Cyclooxygenase-2 Gene in Human T Lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 275, 23627-23635
- Iñiguez, M.A.; Rodríguez, A.; Volpert, O.V.; Fresno, M. and Redondo, J.M. (2003).** Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends in Molecular Medicine* 9, 73-78
- Jakobsson, T.; Treuter, E.; Gustafsson, J.-A. and Steffensen, K.R. (2012).** Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences* 33, 394-404
- Jakobsson, T.; Venteclef, N.; Toresson, G.; Damdimopoulos, A.E.; Ehrlund, A.; Lou, X.; Sanyal, S.; Steffensen, K.R.; Gustafsson, J.-A. and Treuter, E. (2009).** GPS2 Is Required for Cholesterol Efflux by Triggering Histone Demethylation, LXR Recruitment, and Coregulator Assembly at the ABCG1 Locus. *Molecular Cell* 34, 510-518
- Janowski, B.A.; Grogan, M.J.; Jones, S.A.; Wisely, G.B.; Kliewer, S.A.; Corey, E.J. and Mangelsdorf, D.J. (1999).** Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 266-271
- Jiang, Y.J.; Xu, T.-R.; Lu, B.; Mymin, D.; Kroeger, E.A.; Dembinski, T.; Yang, X.; Hatch, G.M. and Choy, P.C. (2003).** Cyclooxygenase expression is elevated in retinoic acid-differentiated U937 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1633, 51-60
- Joseph, S.B.; Bradley, M.N.; Castrillo, A.; Bruhn, K.W.; Mak, P.A.; Pei, L.; Hogenesch, J.; O'Connell, R.M.; Cheng, G.; Saez, E.; Miller, J.F. and Tontonoz, P. (2004).** LXR-Dependent Gene Expression Is Important for Macrophage Survival and the Innate Immune Response. *Cell* 119, 299-309
- Joseph, S.B.; Castrillo, A.; Laffitte, B.A.; Mangelsdorf, D.J. and Tontonoz, P. (2003).** Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nature Medicine* 9, 213-219



**Joseph, S.B.; Laffitte, B.A.; Patel, P.H.; Watson, M.A.; Matsukuma, K.E.; Walczak, R.; Collins, J.L.; Osborne, T.F. and Tontonoz, P. (2002a).** Direct and Indirect Mechanisms for Regulation of Fatty Acid Synthase Gene Expression by Liver X Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 277, 11019-11025

**Joseph, S.B.; McKilligin, E.; Pei, L.; Watson, M.A.; Collins, A.R.; Laffitte, B.A.; Chen, M.; Noh, G.; Goodman, J.; Hagger, G.N.; Tran, J.; Tippin, T.K.; Wang, X.; Lusis, A.J.; Hsueh, W.A.; Law, R.E.; Collins, J.L.; Willson, T.M. and Tontonoz, P. (2002b).** Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 7604-7609

**Joseph, S.B. and Tontonoz, P. (2003).** LXRs: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Current Opinion in Pharmacology* 3, 192-197

**Kang, Y.-J.; Mbonye, U.R.; DeLong, C.J.; Wada, M. and Smith, W.L. (2007).** Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Progress in Lipid Research* 46, 108-125

**Kang, Y.-J.; Wingerd, B.A.; Arakawa, T. and Smith, W.L. (2006).** Cyclooxygenase-2 Gene Transcription in a Macrophage Model of Inflammation. *The Journal of Immunology* 177, 8111-8122

**Kennedy, M.A.; Barrera, G.C.; Nakamura, K.; Baldán, Á.; Tarr, P.; Fishbein, M.C.; Frank, J.; Francone, O.L. and Edwards, P.A. (2005).** ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell metabolism* 1, 121-131

**Khachigian, L.M. (2006).** Early Growth Response-1 in Cardiovascular Pathobiology. *Circulation Research* 98, 186-191

**Kidani, Y. and Bensinger, S.J. (2012).** Liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor as integrators of lipid homeostasis and immunity. *Immunological Reviews* 249, 72-83

**Kim, B.-H.; Kang, K.-S. and Lee, Y.-S. (2004).** Effect of retinoids on LPS-induced COX-2 expression and COX-2 associated PGE2 release from mouse peritoneal macrophages and TNF- $\alpha$  release from rat peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology Letters* 150, 191-201

**Kim, B.; Lee, J.-H.; Yang, M.-S.; Jou, I. and Joe, E.-H. (2008).** Retinoic acid enhances prostaglandin E2 production through increased expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 in rat brain microglia. *Journal of Neuroscience Research* 86, 1353-1360

**Kim, G.H.; Park, K.; Yeom, S.-Y.; Lee, K.J.; Kim, G.; Ko, J.; Rhee, D.-K.; Kim, Y.H.; Lee, H.K.; Kim, H.W.; Oh, G.T.; Lee, K.-U.; Lee, J.W. and Kim, S.-W. (2009).** Characterization of ASC-2 as an Antiatherogenic Transcriptional Coactivator of Liver X Receptors in Macrophages. *Molecular Endocrinology* 23, 966-974

**Kim, H.S.; Ullevig, S.L.; Zamora, D.; Lee, C.F. and Asmis, R. (2012).** Redox regulation of MAPK phosphatase 1 controls monocyte migration and macrophage recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E2803-E2812

**King, V.L.; Trivedi, D.B.; Gitlin, J.M. and Loftin, C.D. (2006).** Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition With Celecoxib Decreases Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26, 1137-1143

**Kratzer, A.; Buchebner, M.; Pfeifer, T.; Becker, T.M.; Uray, G.; Miyazaki, M.; Miyazaki-Anzai, S.; Ebner, B.; Chandak, P.G.; Kadam, R.S.; Calayir, E.; Rathke, N.; Ahammer, H.; Radovic, B.; Trauner, M.; Hoefler, G.; Kompella, U.B.; Fauler, G.; Levi, M.; Levak-Frank, S.; Kostner, G.M. and Kratky, D. (2009).** Synthetic LXR agonist attenuates plaque formation in apoE<sup>-/-</sup> mice without inducing liver steatosis and hypertriglyceridemia. *Journal of Lipid Research* 50, 312-326

- Kuipers, I.; Li, J.; Vreeswijk-Baudoin, I.; Koster, J.; van der Harst, P.; Silljé, H.H.W.; Kuipers, F.; van Veldhuisen, D.J.; van Gilst, W.H. and de Boer, R.A. (2010a).** Activation of liver X receptors with T0901317 attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *European Journal of Heart Failure* 12, 1042-1050
- Kuipers, I.; van der Harst, P.; Kuipers, F.; van Genne, L.; Goris, M.; Lehtonen, J.Y.; van Veldhuisen, D.J.; van Gilst, W.H. and de Boer, R.A. (2010b).** Activation of liver X receptor-[alpha] reduces activation of the renal and cardiac renin-angiotensin-aldosterone system. *Laboratory Investigation* 90, 630-636
- Laffitte, B.A.; Repa, J.J.; Joseph, S.B.; Wilpitz, D.C.; Kast, H.R.; Mangelsdorf, D.J. and Tontonoz, P. (2001).** LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 507-512
- Lammi, J.; Perlmann, T. and Aarnisalo, P. (2008).** Corepressor interaction differentiates the permissive and non-permissive retinoid X receptor heterodimers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 472, 105-114
- Lefebvre, P.; Benomar, Y. and Staels, B. (2010).** Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21, 676-683
- Leik, C.E.; Carson, N.L.; Hennan, J.K.; Basso, M.D.; Liu, Q.Y.; Crandall, D.L. and Nambi, P. (2007).** GW3965, a synthetic liver X receptor (LXR) agonist, reduces angiotensin II-mediated pressor responses in Sprague–Dawley rats. *British Journal of Pharmacology* 151, 450-456
- Levin, N.; Bischoff, E.D.; Daige, C.L.; Thomas, D.; Vu, C.T.; Heyman, R.A.; Tangirala, R.K. and Schulman, I.G. (2005).** Macrophage Liver X Receptor Is Required for Antiatherogenic Activity of LXR Agonists. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25, 135-142
- Li, N.; Rivéra-Bermúdez, M.A.; Zhang, M.; Tejada, J.; Glasson, S.S.; Collins-Racie, L.A.; LaVallie, E.R.; Wang, Y.; Chang, K.C.N.; Nagpal, S.; Morris, E.A.; Flannery, C.R. and Yang, Z. (2010).** LXR modulation blocks prostaglandin E2 production and matrix degradation in cartilage and alleviates pain in a rat osteoarthritis model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 3734-3739
- Li, X.; Zhang, S.; Blander, G.; Tse, J.G.; Krieger, M. and Guarente, L. (2007).** SIRT1 Deacetylates and Positively Regulates the Nuclear Receptor LXR. *Molecular Cell* 28, 91-106
- Liao, S.; Miralles, M.; Kelley, B.J.; Curci, J.A.; Borhani, M. and Thompson, R.W. (2001).** Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms in the rat by treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery* 33, 1057-1064
- Lindholt, J.S. and Shi, G.P. (2006).** Chronic Inflammation, Immune Response, and Infection in Abdominal Aortic Aneurysms. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 31, 453-463
- Linton, M.F. and Fazio, S. (2004).** Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Current Opinion in Pharmacology* 4, 116-123
- Liu, Y.; Qiu, D.K. and Ma, X. (2012).** Liver X receptors bridge hepatic lipid metabolism and inflammation. *Journal of Digestive Diseases* 13, 69-74
- Lo Sasso, G.; Murzilli, S.; Salvatore, L.; D'Errico, I.; Petruzzelli, M.; Conca, P.; Jiang, Z.-Y.; Calabresi, L.; Parini, P. and Moschetta, A. (2010).** Intestinal Specific LXR Activation Stimulates Reverse Cholesterol Transport and Protects from Atherosclerosis. *Cell metabolism* 12, 187-193

- Mangelsdorf, D.J.; Borgmeyer, U.; Heyman, R.A.; Zhou, J.Y.; Ong, E.S.; Oro, A.E.; Kakizuka, A. and Evans, R.M. (1992).** Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes & Development* 6, 329-344
- Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M. (1995).** The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850
- Mangelsdorf, D.J.; Umesono, K.; Kliewer, S.A.; Borgmeyer, U.; Ong, E.S. and Evans, R.M. (1991).** A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 66, 555-561
- Manning, M.W.; Cassis, L.A. and Daugherty, A. (2003).** Differential Effects of Doxycycline, a Broad-Spectrum Matrix Metalloproteinase Inhibitor, on Angiotensin II-Induced Atherosclerosis and Abdominal Aortic Aneurysms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23, 483-488
- Marathe, C.; Bradley, M.N.; Hong, C.; Lopez, F.; de Galarreta, C.M.R.; Tontonoz, P. and Castrillo, A. (2006).** The Arginase II Gene Is an Anti-inflammatory Target of Liver X Receptor in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 281, 32197-32206
- Matsumoto, H.; Naraba, H.; Murakami, M.; Kudo, I.; Yamaki, K.; Ueno, A. and Oh-ishi, S. (1997).** Concordant Induction of Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthase with Cyclooxygenase-2 Leads to Preferred Production of Prostaglandin E<sub>2</sub> over Thromboxane and Prostaglandin D<sub>2</sub> in Lipopolysaccharide-Stimulated Rat Peritoneal Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 230, 110-114
- McCaffrey, T.A.; Fu, C.; Du, B.; Eksinar, S.; Kent, K.C.; Bush, H.; Kreiger, K.; Rosengart, T.; Cybulsky, M.I.; Silverman, E.S. and Collins, T. (2000).** High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation* 105, 653-662
- McClelland, S.; Gawaz, M.; Kennerknecht, E.; Konrad, C.S.I.; Sauer, S.; Schuerzinger, K.; Massberg, S.; Fitzgerald, D.J. and Belton, O. (2009).** Contribution of cyclooxygenase-1 to thromboxane formation, platelet-vessel wall interactions and atherosclerosis in the ApoE null mouse. *Atherosclerosis* 202, 84-91
- Mitchell, J.A. and Warner, T.D. (2006).** COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery* 5, 75-86
- Miyake, T.; Aoki, M.; Nakashima, H.; Kawasaki, T.; Oishi, M.; Kataoka, K.; Tanemoto, K.; Ogihara, T.; Kaneda, Y. and Morishita, R. (2006).** Prevention of abdominal aortic aneurysms by simultaneous inhibition of NF[ $\kappa$ ]B and ets using chimeric decoy oligonucleotides in a rabbit model. *Gene Therapy* 13, 695-704
- Miyake, T. and Morishita, R. (2009).** Pharmacological treatment of abdominal aortic aneurysm. *Cardiovascular Research* 83, 436-443
- Moraes, L.A.; Piqueras, L. and Bishop-Bailey, D. (2006).** Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics* 110, 371-385
- Morales, J.R.; Ballesteros, I.; Deniz, J.M.; Hurtado, O.; Vivancos, J.; Nombela, F.; Lizasoain, I.; Castrillo, A. and Moro, M.A. (2008).** Activation of Liver X Receptors Promotes Neuroprotection and Reduces Brain Inflammation in Experimental Stroke. *Circulation* 118, 1450-1459
- Morello, F.; de Boer, R.A.; Steffensen, K.R.; Gneccchi, M.; Chisholm, J.W.; Boomsma, F.; Anderson, L.M.; Lawn, R.M.; Gustafsson, J.-Å.; Lopez-Illasaca, M.; Pratt, R.E. and Dzau, V.J. (2005).** Liver X receptors alpha and beta regulate renin expression in vivo. *The Journal of Clinical Investigation* 115, 1913-1922

**Murray, P.J. and Wynn, T.A. (2011).** Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews. Immunology* 11, 723-737

**Myhre, A.E.; Ågren, J.; Dahle, M.K.; Tamburstuen, M.V.; Lyngstadaas, S.P.; Collins, J.L.; Foster, S.J.; Thiernemann, C.; Aasen, A.O. and Wang, J.E. (2008).** Liver X Receptor Is A Key Regulator of Cytokine Release in Human Monocytes. *Shock* 29, 468-474

**Nakashima, H.; Aoki, M.; Miyake, T.; Kawasaki, T.; Iwai, M.; Jo, N.; Oishi, M.; Kataoka, K.; Ohgi, S.; Ogihara, T.; Kaneda, Y. and Morishita, R. (2004).** Inhibition of Experimental Abdominal Aortic Aneurysm in the Rat by Use of Decoy Oligodeoxynucleotides Suppressing Activity of Nuclear Factor  $\kappa$ B and ets Transcription Factors. *Circulation* 109, 132-138

**Niknami, M.; Vignarajan, S.; Yao, M.; Hua, S.; Witting, P.K.; Kita, Y.; Shimizu, T.; Sved, P.; Patel, M.I. and Dong, Q. (2010).** Decrease in expression or activity of cytosolic phospholipase A2 $\alpha$  increases cyclooxygenase-1 action: A cross-talk between key enzymes in arachidonic acid pathway in prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801, 731-737

**Ninomiya, Y.; Yasuda, T.; Kawamoto, M.; Yuge, O. and Okazaki, Y. (2007).** Liver X receptor ligands inhibit the lipopolysaccharide-induced expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 and diminish prostaglandin E2 production in murine peritoneal macrophages. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 103, 44-50

**Núñez, V.; Alamed, D.; Rico, D.; Mota, R.; Gonzalo, P.; Cedenilla, M.; Fischer, T.; Boscá, L.; Glass, C.K.; Arroyo, A.G. and Ricote, M. (2010).** Retinoid X receptor  $\alpha$  controls innate inflammatory responses through the up-regulation of chemokine expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 10626-10631

**Panzer, U. and Uguccioni, M. (2004).** Prostaglandin E2 modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. *European Journal of Immunology* 34, 3682-3689

**Patrignani, P.; Tacconelli, S.; Sciulli, M.G. and Capone, M.L. (2005).** New insights into COX-2 biology and inhibition. *Brain Research Reviews* 48, 352-359

**Peng, D.; Hiipakka, R.A.; Dai, Q.; Guo, J.; Reardon, C.A.; Getz, G.S. and Liao, S. (2008).** Antiatherosclerotic Effects of a Novel Synthetic Tissue-Selective Steroidal Liver X Receptor Agonist in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 327, 332-342

**Peng, D.; Hiipakka, R.A.; Xie, J.-T.; Dai, Q.; Kokontis, J.M.; Reardon, C.A.; Getz, G.S. and Liao, S. (2011).** A novel potent synthetic steroidal liver X receptor agonist lowers plasma cholesterol and triglycerides and reduces atherosclerosis in LDLR $^{-/-}$  mice. *British Journal of Pharmacology* 162, 1792-1804

**Pérez, E.; Bourguet, W.; Gronemeyer, H. and de Lera, A.R. (2012).** Modulation of RXR function through ligand design. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821, 57-69

**Phelan, C.A.; Weaver, J.M.; Steger, D.J.; Joshi, S.; Maslany, J.T.; Collins, J.L.; Zuercher, W.J.; Willson, T.M.; Walker, M.; Jaye, M. and Lazar, M.A. (2008).** Selective partial agonism of liver X receptor  $\alpha$  is related to differential corepressor recruitment. *Molecular Endocrinology* 22, 2241-2249

**Porta, C.; Rimoldi, M.; Raes, G.; Brys, L.; Ghezzi, P.; Di Liberto, D.; Dieli, F.; Ghisletti, S.; Natoli, G.; De Baetselier, P.; Mantovani, A. and Sica, A. (2009).** Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor  $\kappa$ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 14978-14983

- Pourcet, B.; Feig, J.E.; Vengrenyuk, Y.; Hobbs, A.J.; Kepka-Lenhart, D.; Garabedian, M.J.; Morris, S.M.; Fisher, E.A. and Pineda-Torra, I.S. (2011).** LXR $\alpha$  Regulates Macrophage Arginase 1 Through PU.1 and Interferon Regulatory Factor 8 / Novelty and Significance. *Circulation Research* 109, 492-501
- Quinet, E.M.; Savio, D.A.; Halpern, A.R.; Chen, L.; Schuster, G.U.; Gustafsson, J.-Å.k.; Basso, M.D. and Nambi, P. (2006).** Liver X Receptor (LXR)- $\beta$  Regulation in LXR $\alpha$ -Deficient Mice: Implications for Therapeutic Targeting. *Molecular Pharmacology* 70, 1340-1349
- Repa, J.J. and Mangelsdorf, D.J. (2000).** The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16, 459-481
- Rigamonti, E.; Chinetti-Gbaguidi, G. and Staels, B. (2008).** Regulation of Macrophage Functions by PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ , and LXRs in Mice and Men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28, 1050-1059
- Robinson-Rechavi, M.; Garcia, H.E. and Laudet, V. (2003).** The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science* 116, 585-586
- Roth, S.H. (2011).** Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy: new avenues for safety. *Clinical Interventions in Aging* 6, 125-131
- Samuelsson, B.; Morgenstern, R. and Jakobsson, P.-J. (2007).** Membrane Prostaglandin E Synthase-1: A Novel Therapeutic Target. *Pharmacological Reviews* 59, 207-224
- Schneider, N.; Lanz, S.; Ramer, R.; Schaefer, D. and Goppelt-Struebe, M. (2001).** Up-regulation of cyclooxygenase-1 in neuroblastoma cell lines by retinoic acid and corticosteroids. *Journal of Neurochemistry* 77, 416-424
- Schönbeck, U.; Sukhova, G.K.; Gerdes, N. and Libby, P. (2002).** TH2 Predominant Immune Responses Prevail in Human Abdominal Aortic Aneurysm. *The American Journal of Pathology* 161, 499-506
- Schultz, J.R.; Tu, H.; Luk, A.; Repa, J.J.; Medina, J.C.; Li, L.; Schwendner, S.; Wang, S.; Thoolen, M.; Mangelsdorf, D.J.; Lustig, K.D. and Bei, S. (2000).** Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & Development* 14, 2831-2838
- Shang, Y. and Brown, M. (2002).** Molecular Determinants for the Tissue Specificity of SERMs. *Science* 295, 2465-2468
- Shimizu, K.; Mitchell, R.N. and Libby, P. (2006).** Inflammation and Cellular Immune Responses in Abdominal Aortic Aneurysms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26, 987-994
- Simmons, D.L.; Botting, R.M. and Hla, T. (2004).** Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews* 56, 387-437
- Smith, C.J.; Morrow, J.D.; Roberts, L.J. and Marnett, L.J. (1993).** Differentiation of Monocytoid THP-1 Cells with Phorbol Ester Induces Expression of Prostaglandin Endoperoxide Synthase-1 (COX-1). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 192, 787-793
- Smoak, K.; Madenspacher, J.; Jeyaseelan, S.; Williams, B.; Dixon, D.; Poch, K.R.; Nick, J.A.; Worthen, G.S. and Fessler, M.B. (2008).** Effects of Liver X Receptor Agonist Treatment on Pulmonary Inflammation and Host Defense. *The Journal of Immunology* 180, 3305-3312
- Sun, H.; Sheveleva, E. and Chen, Q.M. (2008).** Corticosteroids Induce Cyclooxygenase 1 Expression in Cardiomyocytes: Role of Glucocorticoid Receptor and Sp3 Transcription Factor. *Molecular Endocrinology* 22, 2076-2084



- Tajima, T.; Murata, T.; Aritake, K.; Urade, Y.; Hirai, H.; Nakamura, M.; Ozaki, H. and Hori, M. (2008).** Lipopolysaccharide Induces Macrophage Migration via Prostaglandin D2 and Prostaglandin E2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326, 493-501
- Takeuchi, K. (2012).** Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. *World Journal of Gastroenterology* 18, 2147-2160
- Tangirala, R.K.; Bischoff, E.D.; Joseph, S.B.; Wagner, B.L.; Walczak, R.; Laffitte, B.A.; Daige, C.L.; Thomas, D.; Heyman, R.A.; Mangelsdorf, D.J.; Wang, X.; Lusis, A.J.; Tontonoz, P. and Schulman, I.G. (2002).** Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 11896-11901
- Taniura, S.; Kamitani, H.; Watanabe, T. and Eling, T.E. (2002).** Transcriptional Regulation of Cyclooxygenase-1 by Histone Deacetylase Inhibitors in Normal Human Astrocyte Cells. *Journal of Biological Chemistry* 277, 16823-16830
- Terasaka, N.; Hiroshima, A.; Ariga, A.; Honzumi, S.; Koieyama, T.; Inaba, T. and Fujiwara, T. (2005).** Liver X receptor agonists inhibit tissue factor expression in macrophages. *FEBS Journal* 272, 1546-1556
- Terasaka, N.; Hiroshima, A.; Koieyama, T.; Ubukata, N.; Morikawa, Y.; Nakai, D. and Inaba, T. (2003).** T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Letters* 536, 6-11
- Tieu, B.C.; Lee, C.; Sun, H.; LeJeune, W.; Recinos, A.; Ju, X.; Spratt, H.; Guo, D.-C.; Milewicz, D.; Tilton, R.G. and Brasier, A.R. (2009).** An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 3637-3651
- Tilley, S.L.; Coffman, T.M. and Koller, B.H. (2001).** Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of Clinical Investigation* 108, 15-23
- Tontonoz, P. (2011).** Transcriptional and Posttranscriptional Control of Cholesterol Homeostasis by Liver X Receptors. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 76, 129-137
- Tontonoz, P. and Mangelsdorf, D.J. (2003).** Liver X Receptor Signaling Pathways in Cardiovascular Disease. *Molecular Endocrinology* 17, 985-993
- Töröcsik, D.; Szanto, A. and Nagy, L. (2009).** Oxysterol signaling links cholesterol metabolism and inflammation via the liver X receptor in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine* 30, 134-152
- Tsukamoto, H.; Hishinuma, T.; Tayama, R.; Narahara, K.; Suzuki, N.; Tomioka, Y. and Goto, J. (2004).** The induction of prostaglandin E synthase and upregulation of cyclooxygenase-2 by 9-cis retinoic acid. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 74, 61-74
- Venkateswaran, A.; Laffitte, B.A.; Joseph, S.B.; Mak, P.A.; Wilpitz, D.C.; Edwards, P.A. and Tontonoz, P. (2000).** Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 12097-12102
- Walcher, D.; Vasic, D.; Heinz, P.; Bach, H.; Durst, R.; Hausauer, A.; Hombach, V. and Marx, N. (2010).** LXR activation inhibits chemokine-induced CD4-positive lymphocyte migration. *Basic Research in Cardiology* 105, 487-494
- Wang, B.; Chen, J.; Santiago, F.S.; Janes, M.; Kavurma, M.M.; Chong, B.H.; Pimanda, J.E. and Khachigian, L.M. (2010).** Phosphorylation and Acetylation of Histone H3 and Autoregulation by Early Growth Response 1 Mediate Interleukin 1 $\beta$  Induction of Early Growth Response 1 Transcription. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 536-545

**Wang, M.; Lee, E.; Song, W.; Ricciotti, E.; Rader, D.J.; Lawson, J.A.; Puré, E. and FitzGerald, G.A. (2008a).** Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Deletion Suppresses Oxidative Stress and Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *Circulation* 117, 1302-1309

**Wang, M.; Song, W.L.; Cheng, Y. and FitzGerald, G.A. (2008b).** Microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibition in cardiovascular inflammatory disease. *Journal of Internal Medicine* 263, 500-505

**Wang, Y.Y.; Dahle, M.K.; Ågren, J.; Myhre, A.E.; Reinholt, F.P.; Foster, S.J.; Collins, J.L.; Thiemermann, C.; Aasen, A.O. and Wang, J.E. (2006).** Activation of the Liver X Receptor Protects Against Hepatic Injury in Endotoxemia By Suppressing Kupffer Cell Activation. *Shock* 25, 141-146

**Warner, T.D. and Mitchell, J.A. (2004).** Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *The FASEB Journal* 18, 790-804

**Wassef, M.; Upchurch, G.R.; Kuivaniemi, H.; Thompson, R.W. and Tilson, M.D. (2007).** Challenges and opportunities in abdominal aortic aneurysm research. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery* 45, 192-198

**Willy, P.J.; Umesono, K.; Ong, E.S.; Evans, R.M.; Heyman, R.A. and Mangelsdorf, D.J. (1995).** LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes & Development* 9, 1033-1045

**Wu, S.; Yin, R.; Ernest, R.; Li, Y.; Zhelyabovska, O.; Luo, J.; Yang, Y. and Yang, Q. (2009).** Liver X receptors are negative regulators of cardiac hypertrophy via suppressing NF- $\kappa$ B signalling. *Cardiovascular Research* 84, 119-126

**Xiong, W.; Knispel, R.; MacTaggart, J.; Greiner, T.C.; Weiss, S.J. and Baxter, B.T. (2009a).** Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase Regulates Macrophage-dependent Elastolytic Activity and Aneurysm Formation in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 284, 1765-1771

**Xiong, W.; MacTaggart, J.; Knispel, R.; Worth, J.; Persidsky, Y. and Baxter, B.T. (2009b).** Blocking TNF- $\alpha$  Attenuates Aneurysm Formation in a Murine Model. *The Journal of Immunology* 183, 2741-2746

**Xu, X.-M.; Tang, J.-L.; Chen, X.; Wang, L.-H. and Wu, K.K.-y. (1997).** Involvement of Two Sp1 Elements in Basal Endothelial Prostaglandin H Synthase-1 Promoter Activity. *Journal of Biological Chemistry* 272, 6943-6950

**Yamamoto, T.; Shimano, H.; Inoue, N.; Nakagawa, Y.; Matsuzaka, T.; Takahashi, A.; Yahagi, N.; Sone, H.; Suzuki, H.; Toyoshima, H. and Yamada, N. (2007).** Protein Kinase A Suppresses Sterol Regulatory Element-binding Protein-1C Expression via Phosphorylation of Liver X Receptor in the Liver. *Journal of Biological Chemistry* 282, 11687-11695

**Yan, W.; Zhang, T.; Cheng, J.; Zhou, X.; Qu, X. and Hu, H. (2010).** Liver X Receptor Agonist Methyl-3 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxycholesterol Attenuates Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice without Increasing Plasma Triglyceride. *Pharmacology* 86, 306-312

**Yasuda, T.; Grillot, D.; Billheimer, J.T.; Briand, F.o.; Delerive, P.; Huet, S. and Rader, D.J. (2010).** Tissue-Specific Liver X Receptor Activation Promotes Macrophage Reverse Cholesterol Transport In Vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 781-786

**Yasuda, T.; Kanno, M.; Kawamoto, M.; Yuge, O. and Ninomiya, Y. (2005).** Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expression by 22(R)-hydroxycholesterol requires de novo protein synthesis in activated macrophages. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 97, 376-383

**Yen, J.-H.; Khayrullina, T. and Ganea, D. (2008).** PGE2-induced metalloproteinase-9 is essential for dendritic cell migration. *Blood* 111, 260-270

**Yoshimura, K.; Aoki, H.; Ikeda, Y.; Fujii, K.; Akiyama, N.; Furutani, A.; Hoshii, Y.; Tanaka, N.; Ricci, R.; Ishihara, T.; Esato, K.; Hamano, K. and Matsuzaki, M. (2005).** Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nature Medicine* 11, 1330-1338

**Zelcer, N.; Hong, C.; Boyadjian, R. and Peter, T. (2009).** LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 325, 100-104

**Zelcer, N. and Tontonoz, P. (2006).** Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 607-614

**Zhang, J.; Patel, L. and Pienta, K.J. (2010).** Targeting chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) as an example of translation of cancer molecular biology to the clinic. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 95,

**Zhao, C. and Dahlman-Wright, K. (2010).** Liver X receptor in cholesterol metabolism. *Journal of Endocrinology* 204, 233-240

**Zhou, L.; Shen, L.-h.; Hu, L.-h.; Ge, H.; Pu, J.; Chai, D.-j.; Shao, Q.; Wang, L.; Zeng, J.-z. and He, B. (2010).** Retinoid X receptor agonists inhibit phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-induced differentiation of monocytic THP-1 cells into macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry* 335, 283-289



